

Title	フェムト秒レーザー光第二高調波顕微鏡を用いた生体分子ポリマーの構造分析
Author(s)	越, 趙
Citation	
Issue Date	2017-12
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/15077
Rights	
Description	Supervisor:水谷 五郎, マテリアルサイエンス研究科, 博士

- 博士論文 -
- Doctoral Dissertation -

フェムト秒レーザー光第二高調波顕微鏡を用いた
生体分子ポリマーの構造分析

Femto-second laser optical second harmonic microscope for
biomolecular polymers structural analysis

趙 越
Yue Zhao

主指導教員 水谷 五郎
Supervisor Goro Mizutani

北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科
School of Materials Science
Japan Advanced Institute of Science and Technology

2017年12月
December 2017

Copyright © 2015-2017 Zhao Yue. All rights reserved.

ABSTRACT

Second harmonic generation (SHG) is one of nonlinear optical phenomena. SHG occurs in asymmetric media and the SHG frequency will be double of the incident one. We can use this property to construct an SHG microscopic system. One of the characteristics of this SHG microscopy lies in detecting separately the asymmetric part of a substance such as polarized or oriented chiral molecules. Application of the SHG microscopy is expected to various fields such as the development of new materials, elucidation of physical properties, medical diagnosis and so on. In this study, the main research content is the development of the second-order nonlinear optical microscopy by using a femtosecond pulse laser. This second-order nonlinear optical microscopy can be applied to observe and analyze the biomolecular polymers. In this study, the sacran, rice and spider silk was selected as the observation samples.

This new SHG microscopy system was tested first. An SHG microscopic image will be taken several hours by SHG microscope developed in the past. An SHG microscopic image of ZnS polycrystalline pellets was observed in as little as 1 second by using the SHG microscope system developed in this study. The excitation light power was also extremely low value of 0.14 mW. A technology to detect SHG microscopic images in a short time and low excitation power by using a femtosecond pulse laser has been established.

First, sacran with the largest molecular weight was focused in this study. Sacran is a supergiant fibrous polysaccharide extracted from *Aphanothece sacrum* in 2006 and contains hydroxyl, carboxyl, and sulphate groups. Sacran is a 13 μm length polysaccharide and has a ultrahigh molecular weight of 10-30 Mg/mol. Microscopic

sacran is considered to contain chiral structure in large quantities, so that SHG can be active on it. In order to understand the complex structures of sacran, observation of its molecular chains by SHG microscopy was concentrated. The molecular chain of sacran is expected to be oriented anisotropically. On the other hand, sacran have a liquid crystal structure. In a liquid crystal domain, the sacran molecules are expected to be well-oriented and should show a strong second-order nonlinear response. Its structure is expected to be clarified by using the femtosecond pulse laser microscopy. The clarification of the origin of SHG in sacran can contribute to elucidation of macroscopic structure in the sacran molecule.

As the results of experiment, the SHG images of the pure sacran cotton lump, the sacran fibers, and the sacran films were observed. SHG images of the pure sacran cotton lump showed some bright spots with size of several tens of micrometers. Further, I kept the same of the incident optical power, the observation position and integration time, and changed the observation angle only. As a result, even if the same position was measured, the intensity of the SHG has changed. The dependence of the SHG images on the polarization of the incident light was observed. This indicates that sacran molecules in aggregates have anisotropic structure. The polarization dependent SHG microscopic images also showed multilayer structure of liquid crystal domains, and it means that each domain structure has its own orientation.

On the other hand, in the film made from sacran aqueous solution, more continuous SHG signals were observed near the edges of the films. One of the candidate origins of this more continuous SHG is a non-uniform concentration distribution of sacran in the films caused by different evaporation velocity of water from the solution droplet on the substrate during the sample preparation process.

Sacran films in concentric circular electrodes were fabricated, and the sacran molecules were found to generate SHG only near the negative electrode. In particular, extremely strong SHG signals just around the needle electrode were observed. From these results, the origin of SHG of the sacran polymers is judged to be the sacran cations. The incident polarization dependence of the SHG around the neg-

ative needle electrode strongly suggests that the sacran molecules were oriented toward the center of the needle electrode. The X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) measurement told us that the sacran without sulfuric acid mainly aggregates around the negative electrode. It is presumed that the origin of the SHG spot is a highly oriented molecule by cation surrounded by sacran anion.

The second observed sample is an important food as human energy source, the rice. The studying of rice was done mostly by chemical and biological methods. Components of rice such as starch, saccharides and enzymes could be analyzed. However, it is difficult to identify ingredients and spatially track at the same time. In this study, cross section, embryo and endosperm of rice were observed by using the femtosecond pulse laser SHG microscopy. A difficulty observation and discrimination specific place has been extractively visualized. The SHG images from ungerminated glutinous rice (*Oryzaglutinosa* cv. Koshihikari) and glutinous rice (*Oryzaglutinosa* cv. Shintaishomochi) have been observed. The SHG enhancement in the crush cell layer of glutinous rice coincided with the SFG enhancement in the past study. It turned out that the origin was due to the breaking of central symmetry, not resonance of molecular vibration. It can be considered that the second-order nonlinear effect enhancement is induced by the higher density of amylopectin near the crush cell layer or highly orientation of the amylopectin. On the other hand, there is no SHG enhancement effect was observed from the vicinity of the crush cell layer of glutinous rice. It probably due to the SHG inactive amylose exist in the vicinity of the crush cell layer of glutinous rice. The type and distribution of starch in the vicinity of the crush cell layer are different on different rice type. On the other hand, some strong SHG spots were observed on the outside edge of embryonic side. The starch was absent in embryonic. The origin of the SHG spot was estimated by glucose, maltose or both by comparative experiments.

Finally, the sample is spider silk. Spider silk has always been a coveted material. Its tremendous mechanical strength in spite of its thin width has been already paid attention and it has been applied in some fields. Spider silk has properties of high toughness and high strength and is being studied as attractive materials. Many

marvellous molecular structures and mechanisms of spider silk have been discovered so far. On the other hand, the reason for the high strength of spider silk is not well understood yet. Therefore, it is important to analyze the configuration structure of the spider silk. Traditional analytical methods are nuclear magnetic resonance, micro-Raman spectroscopy and micro X-ray diffraction, etc. A helical structure and β -sheet of the spider silk were reported but the material properties in macroscopic conformation of such structures were not fully clarified. An asymmetric β -sheet structure of spider silk should induce nonlinear optical interaction such as second harmonic generation and it is clarified for a radial line of spider. In this study, a homemade nonlinear optical microscope was used to observe the spider silk. The SHG images observed from the radial line are considered to generate from the orientation arrangement of the macroscopic non-centrosymmetric structures. However, no SHG signal was observed from the spiral line. It can be also seen that both the radial line and the spiral line have generated the 2PEF signal. The difference of the compositions between the radial and spiral lines is that the former contains β -sheets structures. Hence, it can be concluded that SHG is induced by β -sheets. In addition, β -sheet in the radial line and dragline is in the form of nanocrystals. The changes of SHG intensity with the different polarization of the incident light was also observed and it indicates that the structure of β -sheets is anisotropic. A model of the microscopic structure of the spider silk was proposed. This study proposed a new and effective method to observe the macroscopic structure of spider silk. Some researchers and manufacturers are trying to create artificial spider silk using biotechnology. The gene and amino acid sequences are known, and so it is easy to make raw protein of silk. However, it is a tremendous challenge to create it into a genuine silk. A simple, quick observation method in this study can provide an effective and direct way to monitor the properties of the natural and artificial spider silk. The SHG image of spider silk reflects also what is happening in the spider's gland. Thus in the future, the secretory glands of the spider can be directly observed to find the mechanism of the production of the silk by this microscope. This work should can promote the biomimetics of spider silk.

In this study, oriented structure in various materials were observed extractively by a homemade femtosecond pulse laser second-order nonlinear optical microscope. The biological polymers were clearly observed by using this femtosecond pulse laser second-order nonlinear optical microscope. Therefore, the performance of this microscope was evaluated. It can contribute to elucidating new properties and structures of materials such as sacran, spider silk and rice.

目次

ABSTRACT	i
第1章 緒言	1
1.1 はじめに	1
1.2 非線形光学の歴史	2
1.3 本研究の背景	3
1.4 本研究の目的	5
1.5 本研究の特色	6
1.6 本論文の構成	8
第2章 非線形光学の基本理論	11
2.1 様々な光学現象	11
2.2 古典論における非線形光学	13
2.3 非線形分極	17
2.4 二次高調波発生	20
2.5 非線形光学の波動方程式	21
2.6 位相整合条件	24
2.7 量子論における非線形光学	28

第 3 章	フェムト秒パルスレーザーを用いた非線形光学顕微鏡	33
3.1	フェムト秒パルスレーザー	33
3.1.1	フェムト秒パルスレーザーシステムの構造	36
3.1.2	チタンサファイアモード同期レーザー	37
3.1.3	モード同期	38
3.1.4	自己集束とカーレンズ効果	40
3.1.5	パルス再生増幅器	42
3.1.6	チャープパルス増幅	43
3.1.7	ポッケルスセル	44
3.1.8	パルス幅の測定	45
3.2	非線形光学顕微鏡システム	48
3.2.1	非線形光学顕微鏡	48
3.2.2	光学フィルターによる“ゴースト”の防止	49
3.2.3	散乱法	51
3.2.4	シリコン基板	53
3.2.5	光学顕微鏡の分解能	54
3.2.6	CMOS イメージセンサと II-CCD イメージセンサ	59
3.2.7	本研究で開発した非線形光学顕微鏡の空間分解能	60
第 4 章	フェムト秒パルスレーザー SHG 顕微鏡システムの性能評価	61
4.1	ZnS 多結晶ペレットのテスト観察	61
4.2	フォトンカウンティングモードにおける短時間積算観察	64

第 5 章	サクランの SHG 顕微像観察	67
5.1	サクラン	67
5.1.1	サクランの構造	69
5.1.2	サクランの溶液物性	70
5.1.3	サクランの金属吸着性	71
5.2	スイゼンジノリ (<i>Aphanothece sacrum</i>) からのサクランの抽出方法	74
5.3	観察用のサクラン	75
5.4	高純度サクランの観察	77
5.4.1	高純度サクランの固定観察	77
5.4.2	高純度サクランの多角度観察	80
5.5	サクラン薄膜の観察	82
5.5.1	サクラン薄膜表面の観察	82
5.5.2	サクラン薄膜表面の多角度観察	84
5.5.3	サクラン薄膜縁部の観察	85
5.5.4	サクラン薄膜縁部の多角度観察	87
5.6	サクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察	89
5.6.1	高純度サクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察	89
5.6.2	高純度サクランにおける SHG スポットの入射光偏光依存性	91
5.6.3	サクランキャスト膜における SHG 顕微像	93
5.7	電氣的刺激によるサクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察	94
5.7.1	電極装置	94
5.7.2	電気泳動における電流-時間変化	96

5.7.3	各電極下のサクラン乾燥体における SHG	96
5.7.4	電極下で成膜したサクランにおける SHG の入射光偏光依存性	99
5.7.5	X 線光電子分光法の測定結果	100
5.8	考察	103
第 6 章	米の SHG 顕微像観察	113
6.1	米種子断面における SHG 観察の背景	113
6.2	米種子における SHG の観察方法	115
6.3	米種子における SHG の観察結果	117
6.4	米種子における SHG の考察	121
第 7 章	蜘蛛の糸の SHG 顕微像観察	125
7.1	蜘蛛の巣および蜘蛛の牽引糸	125
7.2	サンプルの採取と観察方法	128
7.3	蜘蛛の糸の SHG 顕微鏡観察	130
7.3.1	蜘蛛の巣の SHG 顕微鏡観察	130
7.3.2	蜘蛛の牽引糸の SHG 顕微鏡観察	131
7.3.3	蜘蛛の糸における SHG の考察	134
第 8 章	結論	137
8.1	総括	137
8.2	今後の展開と展望	140
	参考文献	143

研究業績	159
謝辭	163

第1章 緒言

1.1 はじめに

顕微鏡技術と画像化技術は生物学と医学の発展に大きな影響を与えている。医用画像処理において核磁気共鳴画像法、断層撮影などよく利用されているが、それらの分解能はいずれもミリメートルオーダーとなっている。一方、光学技術を利用すればマイクロメートルオーダーの分解能を求めることができ、細胞さらに分子までの情報が得られる。どのような光と物質との相互作用でも、適切な設計をすれば新たな顕微鏡として提供することができる。近年、分光技術の発展とともに、例えば、フォトルミネッセンス、ラマン散乱、非線形光学効果などを利用して、多くの新型顕微鏡が開発された。その中で最も注目されたのは蛍光顕微鏡である。サンプル自身の発光あるいは染色試薬での染色により、分子レベルまでの顕微像を観察できる。このような技術は分子生物学において不可欠な道具である。しかし、蛍光顕微鏡では、光退色や細胞毒性副産物が発生するなどの問題があって、生きている細胞や神経などを観察することができないことがある。また、超分解能蛍光顕微鏡で用いた STED (Stimulated emission depletion) は光強度が強すぎてなどの原因で、サンプルが損傷してしまう恐れがある。また、生体マテリアルや生きている細胞への観察において、CARS (Coherent anti-Stokes Raman scattering) 顕微鏡には励起光波長、組織への浸透の限界、使えるパワーの限界など様々な制限がある。また、これら手法は観察対象の全体の構造を可視化するという利点があるが、その中から配向した構造のみを抽出し、観察することは難しい。したがって、蛍光などを利用せず、簡単に生体マテリアルや生きている細胞や神経などを顕微鏡観察ができ、さらに観察対象の構造や配向性が検出できるなら大きな意義がある。

光第二高調波発生 (Second Harmonic Generation, SHG) は非線形光学現象の一

つである。物質に光をあてると、その特定な構造の部分、例えば、非対称な分子や構成単位で、もとの光の周波数が2倍に変わる。反転対称性の物質に対してSHGは禁制である。一方、反転対称性を持たない物質（配向または分極したキラルな分子）に対してSHGは許容となる。この性質を利用した光第二高調波顕微鏡（SHG顕微鏡）で、そのような部分が選択的に観察できる。また、物質の微細構造による表面状態の情報も得ることができる。光第二高調波顕微鏡を用いて、新材料の開発、物性の解明、医療診断など様々な分野への応用が期待されている。

従来の植物、微生物および神経などの組織学的観察では、観察対象を染色によってイメージングする場合がほとんどである。SHG顕微鏡を用いれば、染色による組織への侵入や破壊などを恐れずに観察することが可能となる。さらに、観察対象の分子の配向性が検出できるため、構造情報を得ることもできる。また、SHGの発生は、励起光の瞬間パワーに依存するので、励起光の繰り返し周波数をコントロールすることで、熱によるサンプルへのダメージも回避できる。また、物質によって、サンプルの損傷の少ない波長がある。電子共鳴や分子共鳴の場合を除き、SHGの発生効率は波長に依存しないので、サンプルの損傷の少ない波長の励起光を用い、励起光の瞬間パワーを増やせば、効率よくSHG画像が得られる。

1.2 非線形光学の歴史

レーザーの出現の前には、光学に関する研究は主に弱い光の物質中の伝搬が対象であった。当時は物質の光学性質を決定する屈折率や分極率は光の強度と無関係であった。物質の分極は光の電場に比例し、光は波として重ね合わせの原理を満たした。このような光学問題は線形光学と呼ばれている。

非線形光学は光学の一つの分野として、物質が強い光によって発生する非線形応答を取り扱う。この分野はレーザーの誕生と殆ど同じ頃に発足した。レーザーは高強度の高いコヒーレント光源として、非線形光学の研究において必須なものである。1961年、ミシガン大学のP.A. Franken、A.E. Hill、C.W. PetersおよびG. Weinreichは、波長694 nmのルビーレーザーを水晶のサンプルに集光し、その透過光を分光器で分光し、スペクトルを写真フィルムにとると、波長347 nmの光が発生していることをはじめて報告した[1]。その直後、ハーバード大学のBloembergenらは厳密な

理論分析によって非線形光学の理論的な基礎が確立した [2, 3]。1974 年、Hellwarth らは初めて SHG 顕微鏡を用いて多結晶 ZnSe を観察し [4]、1980 年代に入って、カリフォルニア大学バークリー校の Yuen-Ron Shen (沈元壤) が二次非線形光学の手法で表面分光法に関する研究に極めて大きく貢献した。

レーザーは強い光なので、電場の強度は原子内部のクーロン場に匹敵し、光の物質の相互作用によって非線形効果が発生する。物質の性質を表す物理量 (分極など) は電場の 1 次項だけではなく、高次の項も含む。その結果、線形光学において多くの目立たなかった新しい現象が観察される。また、瞬間強度が極めて強いフェムト秒パルスレーザーを利用すれば、さらに効率よく非線形効果が観察できる。

以下は主な非線形光学効果である。光第二高調波発生 (Second Harmonic Generation) ; 和周波発生 (Sum Frequency Generation) ; 差周波発生 (Difference Frequency Generation) ; 光パラメトリック発生 (Optical Parametric Generation) ; 誘導ラマン散乱 (Stimulated Raman Scattering) ; 四光波混合 (Four-wave Mixing) ; 光カー効果 (Optical Kerr Effect) ; 可飽和吸収 (Saturating Absorption) ; 光ソリトン (Optical Soliton) ; 自己束縛 (Self-trapping; 空間ソリトン (Spatial Soliton) ともいう) ; 自己集束 (Self-focusing) ; 自己位相変調 (Self-phase Modulation) ; パラメトリック蛍光 (Parametric Fluorescence) ; 多光子吸収 (Multi-photon Absorption) ; 光絶縁破壊 (Optical Breakdown) など。

1.3 本研究の背景

非中心対称 (non-centrosymmetric) な結晶は有限な二次の非線形感受率をもつことが一般に知られている [3] が、巨視的に秩序ある構造をもった一部のバイオマテリアルは、極めて高い二次の非線形感受率をもつ。この性質を利用した光第二高調波顕微鏡 (SHG 顕微鏡) 観察により、そのような秩序ある構造の部分が選択的に観察できる [5]。例えば、生体中のコラーゲンは同一方向に並んだポリペプチド鎖の 3 重らせん構造したロポコラーゲンが大量の集まりであるため、SHG 光を発生する [6] ことがよく知られて、その SHG 顕微像も観察された [7, 8, 9]。生体の構造にかかわる他の構造タンパク質 [10] であるチューブリン [11] とミオシン [12] から SHG 顕微像が観察された。生物細胞外のセルロースからも SHG [13] や SFG [14] が発生し、

その繊維状構造において、秩序のある構造は長ければ長いほど SHG が強い [15, 16]。また、デンプンの高次構造が巨視的には非対称性をもつため、強い SHG が発生することがわかり、デンプンの SHG 顕微像も観察された [17, 18]。そして、非対称な分子やナノ構造の選択的観察は、液晶などでも行われている [19, 20]。SHG 顕微鏡による観察では蛍光顕微鏡の場合と異なって試料中の標的分子を染色する必要がなく、光退色や細胞毒性副産物が発生するなどの問題も存在せず [21]、生きている細胞や神経などを観察することができるという長所を持っている [22]。また、生きている生体試料は常に変化しているため、短時間で、非破壊、非侵襲、無染色の測定を行い、高速で顕微像を得ることは非常に意義がある。

さらに SHG 顕微像は医療への応用も期待できる。例えば、二光子三光子および第二高調波発生と組み合わせた多色非線形顕微鏡を用いて、組織形態、細胞代謝、ならびにアルツハイマー病や癌などの疾患状態を直接的な可視化をコンパイルして実証した研究がある [23]。SHG 観察によって、高血圧性腎線維症のマウスモデルの選別を成功した。SHG 顕微鏡は様々な病理における細胞外マトリックスのリモデリングを調査することに役に立つ [24]。SHG 顕微鏡は肝線維症の評価に優れたツールとして浮上し、ほかの線維増殖性病変の研究にも適用可能であると期待できる [25]。また、コラーゲン原線維のシェルからの SHG から、シェルの厚さの変化を知ることによって、今後の診断および研究のツールとして応用できる [26]。SHG はコラーゲンの分布に敏感で高解像度の情報を提供できる。タイプ I とタイプ III のコラーゲンを判別でき、肝硬変の高感度テストもできる。将来、創傷治癒や骨形成不全などの遺伝性膠原病への応用も期待できる [27]。特に、コラーゲン変化は上皮腫瘍の開始と悪化を示す指標である。コラーゲン変化の定量化をリンクすることで上皮腫瘍の悪化を評価することができる。SHG 顕微鏡を用いてコラーゲンの変化における定量化情報を提供、腫瘍を見つけ、腫瘍領域のマージンを決定することができた [28]。SHG 信号はタイプ I と III のコラーゲンを判別できて、傷害や外科手術後の癒痕組織を定性および定量的に評価することができる。術後、特に整形外科術後評価において特に有用である。今、悪性黒色腫の境界線定義を含む臨床症状の評価と診断のツールとしての応用開発も進んでいる [29]。SHG イメージングはコラーゲンアセンブリにおける微小な変化を検出することが可能である。この方法は生物学的組織におけるいくつかの遺伝的な、病理学的な、偶発的なまたは外科的に誘発され

る疾患状態を追跡することができる」と展望されている [30]。また、相対的な拡散障害を推定して、薬物介入後におけるダイナミクスなコラーゲン変化を定量化し、ホルモンリラキシンより誘発された拡散輸送を改善するメカニズムが洞察できると展望されている [31]。

1.4 本研究の目的

本研究はフェムト秒パルスレーザーを用いた非線形光学顕微鏡を開発することが主な研究内容である。その顕微鏡を利用して、高分子や生体組織などのポリマーを観察する。

本研究における第一の目的は、新たに開発した SHG の性能評価である。次に、天然抽出高分子のサクラン、新材料として注目されている蜘蛛の糸、重要な食料である米の三つの生体分子ポリマーを対象として、独自で開発した SHG 顕微鏡を用いて、それらのサンプルを観察し、今まで知られていない性質を解明することが目的である。

まず、一つ目のサンプルとして、最も分子量が大きい分子サクランに注目する。サクランの非常に多様で複雑な構造や分子鎖の配向性に着目し、SHG 顕微鏡を用いて、サクランの対称性がくずれた構成単位を抽出的に検出する。サクランの棒状組織体の「骨格」は編み紐のようになって、キラルな部分が大量に存在する。また、サクランの鎖構造が異方的に配向していると考えられている。フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡で、その構造を抽出的に検出することが一つの目的である。さらに、サクランにおける SHG の起源を解明し、サクラン分子におけるマクロな構造の解明に寄与することはもう一つの目的である。

次に、重要な食糧である米に注目する。米の研究は化学や生物学の手法を用いることがほとんどである。一方、米を構成するデンプン、糖類および酵素などについては、場所を特定しながら成分分析や空間的追跡をすることは難しい。本研究は、フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡で米の断面、胚および胚乳を観察し、いままで観察や判別しにくかった特定な場所を抽出的に画像化することが目的である。

最後に、近年、切望されている新材料である蜘蛛の糸に注目する。新材料として

応用や生産などになる前に、その構造を分析することが重要である。蜘蛛の糸を構成する構造は主にタンパク質における螺旋構造および β -シートであることが知られている。その β -シート構造が配向し、巨視的に異方性な構造をとって、中心対称性を破れ、SHGに許容すると考えている。本研究において、非走査型のフェムト秒パルスレーザー SHG 顕微鏡を用いて、蜘蛛の糸を観察し、蜘蛛の糸におけるマクロな構造の可視化に新たな手段を提供する。

本研究は、独自で開発した非線形光学顕微鏡を用いて、種々の材料における配向した構成単位を抽出的に検出し、分子が配向した誘因を調べる。以上をもって、フェムト秒パルスレーザーを用いた非線形光学顕微鏡を使用して、生体ポリマーを観察することで、この顕微鏡の性能評価し、それぞれのサンプルにおける新たな性質や構造を解明できる。

1.5 本研究の特色

現在報告された SHG 顕微鏡の研究では、光源はほとんど 80 MHz の高繰り返しモードロック Ti:Sapphire レーザーが使われている。高繰り返しのフェムト秒パルス光は、SHG 顕微鏡の光源として二つの問題点がある。まず、物質と相互作用するにはモードロック Ti:Sapphire レーザーのピークパワーではまた足りないため、SHG 信号を検出するには長時間という長い時間が必要である。次に、80 MHz という繰り返し周波数では、試料には大量の熱がたまって、試料の温度が上がりやすい。この問題を解決するため、本研究では再生増幅器を用いて、モードロック Ti:Sapphire レーザーからのフェムト秒パルスのピークパワーを 80000 倍に再生増幅して、SHG 顕微鏡の光源として使用した。繰り返し周波数は 1 kHz にしているので、試料には大量の熱がたまらなくなる。また、ほとんどの SHG 顕微鏡は光源が対物レンズを通して試料に照射するが、光は焦点に絞られて照射面積は極めて小さい。全体像を検出するにはサンプルをスキャンしなければならないから、常に変化しているサンプルに対しては手の施しようがない。本研究では、そういった問題を解決するために、光源を対物レンズを通さずに、斜めから試料に照射し SHG の散乱光を観察し、照射面積はレンズと試料間の距離で調整できる。短時間でサンプルにダメージを与えずターゲットの全体図をとれるシステムを開発した。フェムト秒パルスレーザー

を用いた、高速に像を観察できる独自で開発した SHG 顕微鏡を用いて、いかに様々なサンプルを観察できるか、いかに構造分析に応用できるかは課題である。

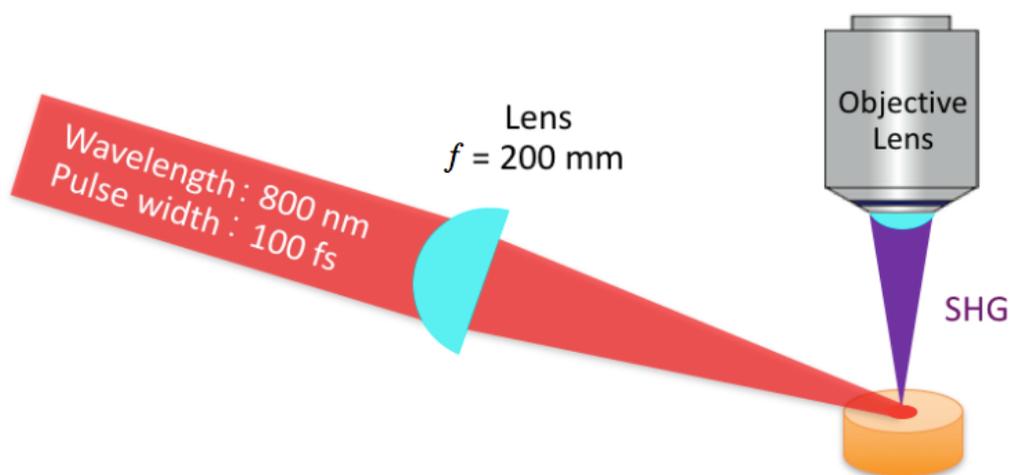


Fig. 1.1 本研究で開発した散乱法による SHG 顕微鏡

本研究の特色は非線形光学顕微鏡を用いて、反転対称性を持たない部分を短時間、非破壊、非侵襲で抽出的に検出することである。従来の蛍光顕微鏡などの光学顕微鏡と比べて、分子が配向した部分だけ、非常に高効率で抽出的に検出できる非線形光学顕微鏡を用いることで、リアルタイムで顕微像を観察することである。非線形光学顕微鏡とは、光第二高調波発生や和周波発生を利用して、試料中の標的分子を染色する必要がなく、光退色や細胞毒性副産物が発生するなどの問題も存在せず、高分子から生きている細胞や神経までなどを観察することができるという長所を持っている。ほとんどのタンパク質や生体ポリマーにおいて、同じ成分で構成しても、構造と機能が大きく異なる。それに関して定性、定量分析からの知見は得られているものの、光学的顕微観察による解析は未踏の道である。

例えば、サクランは水分吸収による不安定性をもつ試料なので、この独自で開発した非線形光学顕微鏡では、効率よく短時間で顕微像を観察することができる。サクランの新しい性質を調べ、さらにその新性質を利用して、サクランを新たなマテリアルとして発展させ、サクランの構造解析において未踏の道を拓き、サクランについての研究に新たな手法を提供している。

また、日常生活で食べている米は、主にデンプンから構成されている。デンプンをさらにアミロースとアミロペクチンにわけることができる。いずれも従来のヨウ素デンプン反応で呈色し観察できるが、米の種子において、両者が混在していて、呈色反応で区別することが困難である。赤外吸収スペクトルを利用して定性分析できるが、物質の場所依存性を特定できないのは問題点である。非線形光学顕微鏡を用いて、場所を特定できる観察ができる。

また、蜘蛛の糸について、ミクロな構造における場所依存性は X 線回折や NMR では無力である。糸を構成する β -シートは糸において、どういうふうに、どんな形で配向しているかはまだ解明されていない。本研究で開発した非線形光学顕微鏡を用いれば、容易に β -シートでできた結晶領域のミクロな構造を観察できる。

1.6 本論文の構成

本論文の主要な内容は以下の通りである。

- (1) 非線形光学の歴史、他の研究者の例のレビューおよび本研究の背景、目的と特色
- (2) 非線形光学の基本理論
- (3) フェムト秒パルスレーザーおよび再生増幅器の原理の説明
- (4) フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムの構築
- (5) フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムの性能評価
- (6) SHG 顕微鏡を用いたサクラン凝縮体の観察とその構造解析
- (7) SHG 顕微鏡を用いた二種の米種子の観察とその構造解析
- (8) SHG 顕微鏡を用いた蜘蛛の巣および牽引糸の観察とその構造解析

(1), (2) に関しては第 1, 2 章で述べる。(3) に関しては 3.1 節、(4) に関しては第 3.2 節で、フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムの開発と改良を述べる。(5) に関しては第 4.1 節でフェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムの性能評価について述べる。(6) に関しては第 5 章、(7) に関しては第 6 章、(8) に関しては第 7 章で、生体分子ポリマーであるサクラン、米の種子、蜘蛛の糸、

三つのサンプルについて、二次の非線形光学顕微鏡を用いた観察および構造分析を述べる。

第2章 非線形光学の基本理論

2.1 様々な光学現象

電子は加速度を持って動くと光が発生する。例えば、アンテナの中で電子が動く、低い周波数の電磁波が発生する。分子振動においては分子の中の原子が互いに動くので赤外線が発生する。電子遷移が起こったとき、可視光やX線などの高い周波数の光が発生する。また、溶鉱炉の中の温度は、その色から判断できる。つまり熱でも光が発生する。その光の周波数は温度に依存する。

物質は光で照らすと様々な反応を起こす。物質は外部刺激（入射光または励起光）に対して、通過、屈折、反射、吸収、散乱、発光などの光学応答を起こす。例えば、光が分子に当たると散乱する。波長の短い光は長い波長の光よりよく散乱する。空が青いのは光の散乱の効果である。また、例えば入射光から色がずれて散乱する現象にラマン散乱がある。このような電磁波と物質との相互作用についての学問分野は光物性と呼ばれる。光物性は主に電磁波の生成と性質や電磁波と物質との相互作用、特にその操作について研究する。研究者たちは波長の長い光から γ 線までの各周波数領域に対して、安定で優秀な光源を開発することを試みてきた。線形光学、非線形光学、分光学などはすべて光物性で取り扱う学問である。これらでは様々な線形または非線形現象について分析・解明する。レーザーの発明は光物性の研究、特に非線形光学の研究に有利な武器を提供した。また、量子光学やフェムト秒光学の進歩も光物性の研究に新たな方向を示した。

図2.1示したのは光が物質に入射して起こした様々な光学現象である。光が物質に入射すると、一部は後方散乱光として反射されたり、物質に吸収されたり、素通りしたりする。また、吸収された光が放出する現象もある。波長がそのままの散乱

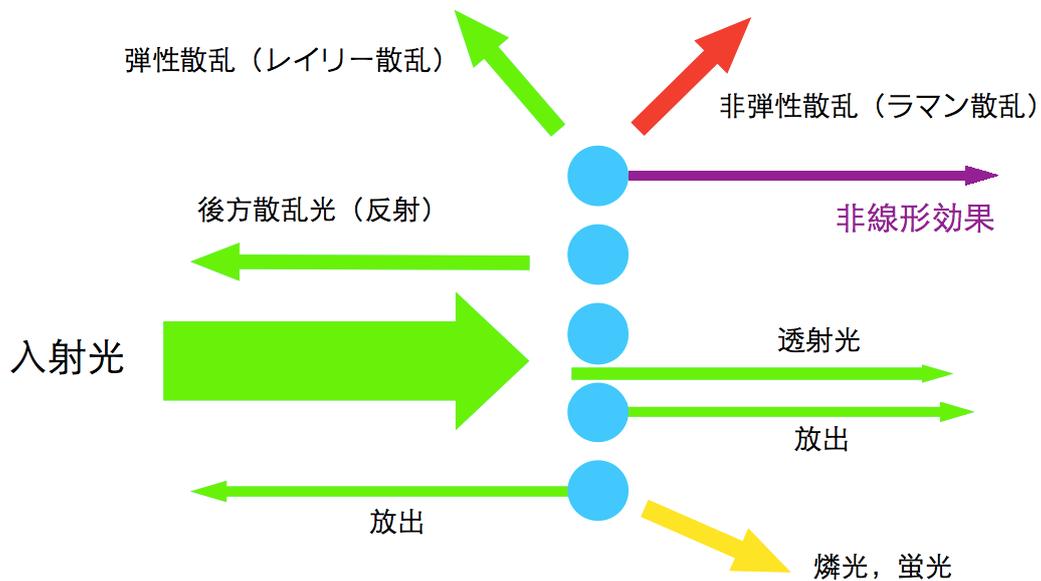


Fig. 2.1 光が物質に入射して起こした様々な光学現象

は弾性散乱である。レイリー散乱は代表的な弾性散乱である。一方、波長がずれて散乱する現象は非弾性散乱である。ラマン散乱は代表的な非弾性散乱である。物質は光を吸収して励起状態になる。ある物質はすぐに基底状態に戻って蛍光を発する。一方、パウリの排他原理より、スピン多重度が異なる遷移は禁制であるので、ある物質はゆっくり基底状態に戻る。そのとき発生する光は燐光である。一部の物質においては非線形効果が発生する。例えば、反転対称性が破れた物質の場合、物質中で2つのエネルギーの同じ入射光光子が融合して和のエネルギーを持つ1つの光子となるような現象は二次の非線形光学効果であり、第二高調波発生という。また、和周波発生、差周波発生、光パラメトリック効果、カー効果など様々な非線形光学効果がある。

2.2 古典論における非線形光学

最外殻電子は原子核からの束縛力が最も弱い。結晶における分極はほとんど最外殻電子が電磁場の作用によって変位して生じたものと考えられる。ここで、一つに分極は一つの振動子として、その電磁波の作用を受ける振動子の一次元の運動方程式を立てて解いてみよう。

電子を束縛するポテンシャル $U(x)$ は

$$U(x) = \frac{1}{2}m\omega_0^2x^2 + \frac{1}{3}max^3 + \dots \quad (2.1)$$

となる。偶次項のみの場合は対称となるが、3次の項がある場合は非対称となる。ここで、 $\omega_0 = \sqrt{k/m}$ である。

電子の回復力は

$$F = -\frac{\partial U(x)}{\partial x} = -(m\omega_0^2x + max^2 + \dots) \quad (2.2)$$

となる。

電子と光の相互作用はローレンツ力である。その運動方程式は

$$\ddot{x} + \gamma\dot{x} + \omega_0^2x + ax^2 = \frac{-\lambda e}{m}E(t) \quad (2.3)$$

となる。右辺はローレンツ力である。

この運動方程式は摂動法を用いて解ける。 λ は小さい数であるとしたら、 $-\lambda eE(t)$ も小さい。これは、摂動法の考え方である。ここで、

$$E(t) = \frac{1}{2}\{E^\omega e^{-i\omega t} + E^{\omega*} e^{-i\omega t}\} \quad (2.4)$$

$$x(t) = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad (2.5)$$

式(2.4)と(2.5)を式(2.3)に代入すると

$$\begin{aligned} &\lambda \ddot{x}^{(1)} + \lambda \gamma \dot{x}^{(1)} + \lambda \omega_0^2 x^{(1)} + \\ &\lambda^2 \ddot{x}^{(2)} + \lambda^2 \gamma \dot{x}^{(2)} + \lambda^2 \omega_0^2 x^{(2)} + a \left(\lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} \right)^2 = \frac{-\lambda e}{m} E(t) \end{aligned} \quad (2.6)$$

となる。

1 次の λ について

$$\ddot{x}^{(1)} + \gamma \dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} = \frac{-e}{m} E(t) \quad (2.7)$$

$$x^{(1)} = x^\omega e^{-i\omega t} \quad (2.8)$$

におくと、運動方程式は

$$-\omega^2 x^\omega e^{-i\omega t} + (-i\omega) \gamma x^\omega e^{-i\omega t} + \omega_0^2 x^\omega e^{-i\omega t} = -\frac{e}{m} \frac{1}{2} E^\omega e^{-i\omega t} \quad (2.9)$$

となる。電場の共役項も同様に計算すると、解は

$$x^{(1)}(t) = -\frac{e}{2m} \frac{E^\omega e^{-i\omega t}}{D(\omega)} - \frac{e}{2m} \frac{E^{\omega*} e^{i\omega t}}{D^*(-\omega)} \quad (2.10)$$

となる。ただし、

$$D(\omega) = \omega_0^2 - \omega^2 - i2\gamma\omega = D^*(-\omega) \quad (2.11)$$

である。

電子密度は N 、電子は平衡する位置から離れた距離は x とすると、分極 P は

$$P = -Nex(t) \quad (2.12)$$

となる。

まず、線形の電気感受率について述べる。式 (2.10) を式 (2.12) に代入すると、分極は

$$\begin{aligned} P^{(1)}(t) &= \frac{Ne^2}{2m} \left[\frac{E^\omega e^{-i\omega t}}{D(\omega)} + c.c. \right] \\ &= \frac{1}{2} \left[P^{(1)}(\omega) e^{-i\omega t} + P^{(1)*}(\omega) e^{i\omega t} \right] \\ &= \varepsilon_0 \chi^{(1)}(\omega) E^\omega \end{aligned} \quad (2.13)$$

となる。比誘電率 ε^ω は

$$\varepsilon^\omega = 1 + \chi^{(1)}(\omega) = 1 + \frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2 - i2\gamma\omega)} \quad (2.14)$$

となる。 $\gamma \ll \omega$ から $\omega \rightarrow \omega_0$ のとき $\varepsilon^\omega \rightarrow \infty$ となり、共鳴が起こる。虚部は物質の吸収係数を表す項であり、 γ は吸収線幅である。

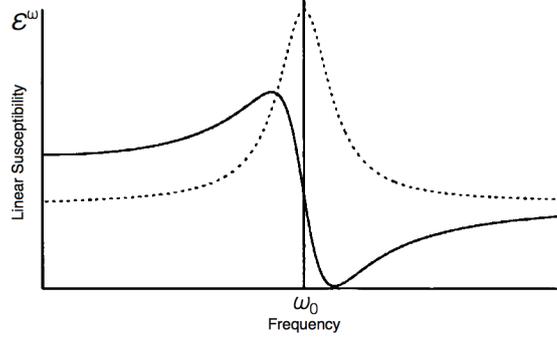


Fig. 2.2 Linear Susceptibility

次に、非調和項について述べる。

2 次の λ について

$$\ddot{x}^{(2)} + \gamma \dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} + a(x^{(1)})^2 = 0 \quad (2.15)$$

$$(x^{(1)}(t))^2 = \frac{e^2}{4m^2} \frac{2E^\omega E^{\omega*}}{D(\omega) D^*(\omega)} + \frac{e^2}{4m^2} \frac{(E^\omega)^2 e^{-i2\omega t}}{D^2(\omega)} + \frac{e^2}{4m^2} \frac{(E^{\omega*})^2 e^{i2\omega t}}{D^{*2}(\omega)} \quad (2.16)$$

となる。式 (2.16) の右辺の第一項は光整流（周波数ゼロの電磁波）である。第二、第三項は二次の高調波である。

式 (2.16) を式 (2.15) に代入して、運動方程式の解は

$$x^{(2)}(t) = \frac{-ae^2}{4m^2} \left[\frac{(E^\omega)^2 e^{-i2\omega t}}{D^2(\omega) D(2\omega)} + c.c. \right] \quad (2.17)$$

となり、二倍の周波数の振動である。

式 (2.17) と式 (2.12) に代入すると、分極は

$$P^{(2)}(t) = \frac{Nae^3}{4m^2} \left[\frac{(E^\omega)^2 e^{-i2\omega t}}{D^2(\omega) D(2\omega)} + c.c. \right] \quad (2.18)$$

$$P^{(2)}(2\omega) = \frac{1}{4} \varepsilon_0 \chi^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) E^\omega E^\omega \quad (2.19)$$

となり、 $P^{(2)}$ は非線形分極である。式 (2.18) と式 (2.19) より、2 次の電気感受率 $\chi^{(2)}$ は

$$\chi^{(2)}(2\omega; \omega, \omega) = \frac{2Nae^3}{\varepsilon_0 m^2} \frac{1}{D^2(\omega) D(2\omega)} \quad (2.20)$$

となる。

また、周波数 ω_1 と周波数 ω_2 の二つの光が入射したとすると、電子の運動方程式は

$$\ddot{x} + \gamma \dot{x} + \omega_0^2 x + ax^2 = \frac{e}{m} \text{Re} [E_1 e^{i(k_1 z - \omega_1 t)} + E_2 e^{i(k_2 z - \omega_2 t)}] \quad (2.21)$$

となる。

非調和項の解は

$$x(\omega_1 + \omega_2) = \frac{-ae^2}{m^2} \frac{E_1 E_2}{D(\omega_1) D^*(\omega_2) D(\omega_1 + \omega_2)} e^{i[(k_1 + k_2)z - (\omega_1 + \omega_2)t]} \quad (2.22)$$

となる。2 次の電気感受率 $\chi^{(2)}$ は

$$\chi^{(2)}(\omega_1 + \omega_2; \omega_1, \omega_2) = \frac{2Nae^3}{\varepsilon_0 m^2} \frac{1}{D(\omega_1) D^*(\omega_2) D(\omega_1 + \omega_2)} \quad (2.23)$$

となる。[3, 32]

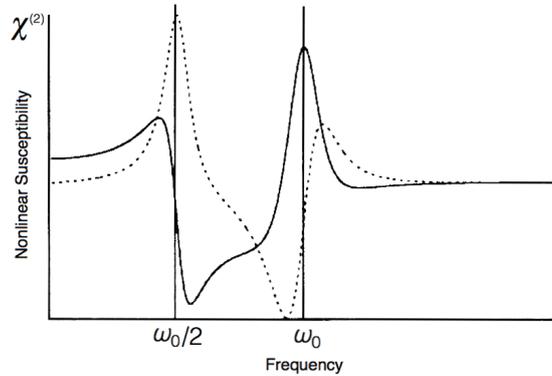


Fig. 2.3 Nonlinear Susceptibility

係数 a はポテンシャルの3次の係数である。もし、ポテンシャルが対称であれば、3次の項はゼロになり、2次の電気感受率のゼロになる。つまり、対称なポテンシャルの場合は、二次の非線形分極が生じない。一方、非対称のポテンシャルであれば、二次の非線形分極が生じて、二次高調波や和周波数が発生する。

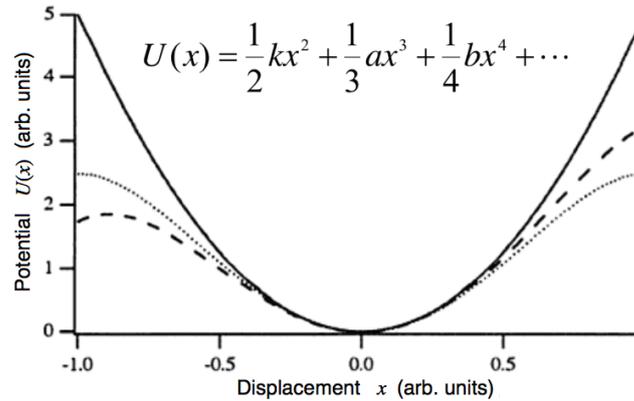


Fig. 2.4 Potential curves for different forms of the restoring force. Solid: linear (only k non zero), dotted: nonlinear first order (k and b non zero) and dashed: nonlinear second order (k , a and b non zero).

2.3 非線形分極

電磁波（光）と物質の相互作用で分極が生じる。分極は物質中の原子（分子、イオン）の電気双極子である。電磁波の周波数で周期的に振動する。つまり、強制振動の周波数は電磁波の周波数と同じである。電気双極子の振動で電磁放射が生じる。入射光強度が弱いとき、分極 \mathbf{P} は入射光電場 \mathbf{E} とは線形的な関係すなわち比例する。しかし、レーザーの誕生に伴い、光高調波発生、和周波発生、差周波発生などの現象が次々と観察された。これらの現象を解釈するためには、分極 \mathbf{P} と入射光電場 \mathbf{E} は線形的な関係の代わりに、電場 \mathbf{E} はべき級数に展開して分極 \mathbf{P} を記述する。

マックスウエル方程式における電気変位 \mathbf{D} 磁束密度 \mathbf{B} は

$$\mathbf{D} = \varepsilon(\mathbf{E}) \mathbf{E} \quad , \quad \mathbf{B} = \mu(\mathbf{H}) \mathbf{H} \quad (2.24)$$

の非線形な特性が当初から知られて、誘電率 ε は電場 \mathbf{E} の関数、透磁率 μ は磁場 \mathbf{H} の関数となっている。非線形材料の分極 \mathbf{P} は電場 \mathbf{E} のべき級数に展開して記述される。例えば、単純な電気双極子では

$$\begin{aligned} \mathbf{P} &= \mathbf{P}^{(1)} + \mathbf{P}^{(2)} + \mathbf{P}^{(3)} + \dots \\ &= \varepsilon_0 \left(\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(1)} \mathbf{E} + \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(3)} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots \right) \end{aligned} \quad (2.25)$$

第一項の $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(1)}$ は線形の電気感受率を、第二項の $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)}$ は2次の電気感受率であり、最も低次の非線形電気感受率と定義されている。光の強度が弱いとき、光学的な非線形効果は小さいから、実験的には発見しにくかった。レーザーの誕生後は、高強度の光源を用いて非線形効果を実験で観測できるようになった。

さて、2次の電気感受率 $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)}$ について考えてみよう。 $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)}$ は3階のテンソルである。成分の数は27個あり、次のように書ける。

$$\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} = \begin{pmatrix} \chi_{xxx} & \chi_{xxy} & \chi_{xxz} & \chi_{xyx} & \chi_{xyy} & \chi_{xyz} & \chi_{xzx} & \chi_{xzy} & \chi_{xzz} \\ \chi_{yxx} & \chi_{yyx} & \chi_{yxy} & \chi_{yyx} & \chi_{yyy} & \chi_{yyz} & \chi_{yzx} & \chi_{yzy} & \chi_{yzz} \\ \chi_{zxx} & \chi_{zxy} & \chi_{zxz} & \chi_{zyx} & \chi_{zyy} & \chi_{zyz} & \chi_{zzx} & \chi_{zzy} & \chi_{zzz} \end{pmatrix} \quad (2.26)$$

反転対称性を持った場合ではゼロになる。反転対称性が破れた結晶においては2次の電気感受率テンソル $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)}$ の非ゼロ成分は、圧電率テンソルの非ゼロ成分と同じである。

また、2次の非線形分極は

$$\mathbf{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} \quad (2.27)$$

と書ける。右辺を展開すると

$$\begin{aligned} P_i^{(2)} = \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} &= \varepsilon_0 \sum_{j,k=x,y,z} \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k \\ &= \varepsilon_0 \chi_{ixx}^{(2)} E_x E_x + \varepsilon_0 \chi_{ixy}^{(2)} E_x E_y + \varepsilon_0 \chi_{ixz}^{(2)} E_x E_z + \\ &\quad \varepsilon_0 \chi_{iyx}^{(2)} E_y E_x + \varepsilon_0 \chi_{iyy}^{(2)} E_y E_y + \varepsilon_0 \chi_{iyz}^{(2)} E_y E_z + \\ &\quad \varepsilon_0 \chi_{izx}^{(2)} E_z E_x + \varepsilon_0 \chi_{izy}^{(2)} E_z E_y + \varepsilon_0 \chi_{izz}^{(2)} E_z E_z \end{aligned} \quad (2.28)$$

となる。非線形分極 $\mathbf{P}^{(2)}$ の一つの方向について $P_i^{(2)}$ は9つの成分の和となる。非線形分極 $\mathbf{P}^{(2)}$ の x 、 y 、 z 成分を全部書くと

$$\begin{pmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{pmatrix} = \varepsilon_0 \begin{pmatrix} \chi_{xxx}^{(2)} E_x E_x + \chi_{xxy}^{(2)} E_x E_y + \chi_{xxz}^{(2)} E_x E_z + \\ \chi_{xyx}^{(2)} E_y E_x + \chi_{xyy}^{(2)} E_y E_y + \chi_{xyz}^{(2)} E_y E_z + \\ \chi_{xzx}^{(2)} E_z E_x + \chi_{xzy}^{(2)} E_z E_y + \chi_{xzz}^{(2)} E_z E_z \\ \\ \chi_{yxx}^{(2)} E_x E_x + \chi_{yxy}^{(2)} E_x E_y + \chi_{yxz}^{(2)} E_x E_z + \\ \chi_{yyx}^{(2)} E_y E_x + \chi_{yyy}^{(2)} E_y E_y + \chi_{yyz}^{(2)} E_y E_z + \\ \chi_{yzx}^{(2)} E_z E_x + \chi_{yzy}^{(2)} E_z E_y + \chi_{yzz}^{(2)} E_z E_z \\ \\ \chi_{zxx}^{(2)} E_x E_x + \chi_{zxy}^{(2)} E_x E_y + \chi_{zxz}^{(2)} E_x E_z + \\ \chi_{zyx}^{(2)} E_y E_x + \chi_{zyy}^{(2)} E_y E_y + \chi_{zyz}^{(2)} E_y E_z + \\ \chi_{zzx}^{(2)} E_z E_x + \chi_{zzy}^{(2)} E_z E_y + \chi_{zzz}^{(2)} E_z E_z \end{pmatrix} \quad (2.29)$$

になる。しかし、 j 、 k を入れ換えても同じ物理的意味をもつ場合（例えば、二次高調波発生）、 jk の成分と kj の成分は重複する。つまり、 $\chi_{ijk}^{(2)} = \chi_{ikj}^{(2)}$ である。このとき、27個の成分から18個の独立な成分になる。

非線形分極は媒質の対称性に依存する。反転対称性のある媒質において、電場を反転したら分極も反転して生じる。従って、2次の非線形分極 $\mathbf{P}^{(2)}$ は

$$\mathbf{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : \mathbf{E}\mathbf{E} \quad (2.30)$$

$$-\mathbf{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : (-\mathbf{E})(-\mathbf{E}) \quad (2.31)$$

となる。電場は反転しても物質は変化しないから、 $\mathbf{P}^{(2)} = -\mathbf{P}^{(2)}$ となり、 $\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} = 0$ でなければならない。ゆえに、2次（一般に偶数次）の非線形分極は反転対称性のない物質にのみできる。

2.4 二次高調波発生

非線形分極ができると、新しい周波数の電磁波が発生する。入射光である基本波 \mathbf{E}_1 と非線形分極により発生した高調波 \mathbf{E}_2 について考えてみる。

$$\mathbf{E}_1 = \mathbf{E}_1^{(\omega_1)} \exp[-i(\omega_1 t - \mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r})] + c.c. \quad (2.32)$$

式 (2.27) より

$$\mathbf{P}^{(2)} = \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)}(2\omega_1; \omega_1, \omega_1) \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_1 \exp[i(2\mathbf{k}_1) \cdot \mathbf{r} - i(2\omega_1)t] \quad (2.33)$$

は ω から作られた非線形分極であり、これより高調波が発生することがわかった。

非線形光学の波動方程式 (詳細は 2.5 節で述べる) について $\varepsilon \mathbf{E} = \varepsilon_0 (1 + \chi) \mathbf{E} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}^L$ を用いて変形すると、左辺は電場、右辺は分極にすれば、非線形光学の波動方程式は

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(\mathbf{E} + \frac{\mathbf{P}^L}{\varepsilon_0} \right) = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}^{NL} \quad (2.34)$$

となる。 $\varepsilon_0 \mu_0 = 1/c^2$ 、 c は真空中の光速である。 \mathbf{P}^L は線形分極である。基本波 \mathbf{E}_1 と高調波 \mathbf{E}_2 をそれぞれ式 (2.34) に代入すると

$$\nabla^2 \mathbf{E}_1 - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(\mathbf{E}_1 + \frac{\mathbf{P}_1^L}{\varepsilon_0} \right) = \mathbf{0} \quad (2.35)$$

$$\nabla^2 \mathbf{E}_2 - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(\mathbf{E}_2 + \frac{\mathbf{P}_2^L}{\varepsilon_0} \right) = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}_2^{NL} \quad (2.36)$$

となる。式 (2.35) は ω に関する普通の波動方程式である。式 (2.36) は ω から作られた非線形分極を含む波動方程式である。分極の方向は電場の方向の射影成分をとったものとする、分極は電場に平行になるからスカラー量とする。 z 方向に進むとすると、式 (2.36) は

$$\frac{\partial^2 E_2}{\partial z^2} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(E_2 + \frac{P_2^L}{\varepsilon_0} \right) = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} P_2^{NL} \quad (2.37)$$

と書ける。この方程式を解いて、解の E_2 が得る。その解き方と解について後述べる。

2.5 非線形光学の波動方程式

一般の媒質中において、Maxwell 方程式は

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho \quad (2.38)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (2.39)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (2.40)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} + \mathbf{j} \quad (2.41)$$

となる。 \mathbf{E} は電場強度、 \mathbf{H} は磁場強度、 \mathbf{D} は電束密度 (電気変位)、 \mathbf{B} は磁束密度、 \mathbf{j} は電流密度である。ここで、電流密度 \mathbf{j} 、電気変位 \mathbf{D} と分極 \mathbf{P} は

$$\mathbf{j} = \sigma \mathbf{E} \quad (2.42)$$

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (2.43)$$

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0 \chi \mathbf{E} + \mathbf{P}^{NL} \quad (2.44)$$

となり、式 (2.44) を式 (2.43) に代入すると電気変位 \mathbf{D} は

$$\begin{aligned} \mathbf{D} &= \varepsilon_0 \mathbf{E} + \varepsilon_0 \chi \mathbf{E} + \mathbf{P}^{NL} \\ &= \varepsilon_0 (1 + \chi) \mathbf{E} + \mathbf{P}^{NL} \\ &= \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\varepsilon} \cdot \mathbf{E} + \mathbf{P}^{NL} \end{aligned} \quad (2.45)$$

となり、 \mathbf{P}^{NL} は非線形分極である。式 (2.42) と式 (2.45) を式 (2.41) の Ampère's circuital law に代入すると

$$\nabla \times \mathbf{H} = \sigma \mathbf{E} + \varepsilon_0 \overset{\leftrightarrow}{\varepsilon} \cdot \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} + \frac{\partial \mathbf{P}^{NL}}{\partial t} \quad (2.46)$$

となる。また、式 (2.40) の Maxwell-Faraday equation より

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = -\mu_0 \frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times \mathbf{H}) \quad (2.47)$$

となり、ここで、

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) = \nabla (\nabla \cdot \mathbf{E}) - \nabla^2 \mathbf{E} \quad (2.48)$$

と用いて、ただし、等方性媒質では、光は横波なので、 $\nabla \cdot \mathbf{E} = 0$ である。式(2.47)は

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \mu_0 \frac{\partial}{\partial t} (\nabla \times \mathbf{H}) \quad (2.49)$$

となる。 $\nabla \cdot \mathbf{D} = 0$ と $\nabla \cdot \mathbf{P} = 0$ （分極の空間変化は小さいとする）を用いて、式(2.46)を式(2.49)に代入すると

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \sigma \mu_0 \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{E} + \varepsilon_0 \mu_0 \overset{\leftrightarrow}{\varepsilon} \cdot \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} + \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}^{NL} \quad (2.50)$$

となり、式(2.50)は非線形光学の波動方程式である。非線形分極 \mathbf{P}^{NL} より発生した電磁波（二次高調波や和周波数など）は式(2.50)の波動方程式に従って伝搬する。

また、電流密度 $\mathbf{j} = \mathbf{0}$ のとき、 $\sigma = 0$ なので、式(2.50)は

$$\nabla^2 \mathbf{E} = \varepsilon_0 \mu_0 \overset{\leftrightarrow}{\varepsilon} \cdot \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} + \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}^{NL} \quad (2.51)$$

となる。

ここで、電場は

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} (E_\omega \hat{e}_\omega \exp(-i[\omega t - \mathbf{k}_\omega \cdot \mathbf{r}]) + c.c.) \quad (2.52)$$

を式(2.51)に代入すると、非線形光学波動方程式は

$$-\nabla^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) + \frac{\varepsilon(\mathbf{r}, t)}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = -\frac{1}{\varepsilon_0 c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}, t) \quad (2.53)$$

となり、2次の非線形分極 $\mathbf{P}^{(2)}$ は

$$\mathbf{P}^{(2)}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} (P_{2\omega} \hat{q} \exp(-i[2\omega t - \mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r}]) + c.c.) \quad (2.54)$$

ただし、

$$P_{2\omega}\hat{q} = \varepsilon_0 K^{(2)} \left(\overset{\leftrightarrow}{\chi}^{(2)} : \hat{e}_\omega \hat{e}_\omega - \nabla \cdot \left(\overset{\leftrightarrow}{\chi}_Q^{(2)} : \hat{e}_\omega \hat{e}_\omega \right) + \frac{\mu_0}{i\omega} \nabla \times \left(\overset{\leftrightarrow}{\chi}_M^{(2)} : \hat{e}_\omega \hat{e}_\omega \right) \right) |E_\omega|^2 \quad (2.55)$$

となる。ここで、 \hat{e}_ω 、 \hat{q} は偏光の成分である。運動量については、

$$\mathbf{k}_s = 2\mathbf{k}_\omega \quad (2.56)$$

$$|\mathbf{k}_s|^2 = 4\varepsilon_\omega \frac{\omega^2}{c^2} \quad (2.57)$$

となる。

式(2.53)の非線形波動方程式は非斉次微分方程式なので、斉次解と非斉次解をもつ。

非斉次解は

$$\mathbf{E}_{IH}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{2} (E_{2\omega} \hat{e}_{2\omega} \exp(-i[2\omega t - \mathbf{k}_s \cdot \mathbf{r}]) + c.c.) \quad (2.58)$$

となり、強制振動である。伝搬速度は ω に依存する。

斉次解は

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_H(\mathbf{r}, t) = & \frac{1}{2} (E_{2\omega}^+ \hat{e}_{2\omega}^+ \exp(-i[2\omega t - \mathbf{k}_s^+ \cdot \mathbf{r}]) + c.c.) \\ & + \frac{1}{2} (E_{2\omega}^- \hat{e}_{2\omega}^- \exp(-i[2\omega t - \mathbf{k}_s^- \cdot \mathbf{r}]) + c.c.) \end{aligned} \quad (2.59)$$

となり、自由振動である。伝搬速度は 2ω に依存する。

ただし、

$$E_{2\omega} \hat{e}_{2\omega} = \frac{(2\omega)^2}{\varepsilon_0 c^2} \frac{1}{|\mathbf{k}_s|^2 - |\mathbf{k}_{2\omega}|^2} \left[\hat{q} - \frac{c^2}{\varepsilon_{2\omega} (2\omega)^2} (\mathbf{k}_{2\omega} \cdot \hat{q}) \mathbf{k}_{2\omega} \right] P_{2\omega} \quad (2.60)$$

となる。運動量については、

$$|k_{2\omega}^+|^2 = |k_{2\omega}^-|^2 = 4\varepsilon_{2\omega} \frac{\omega^2}{c^2} \quad (2.61)$$

となる。

二つにおいて、伝搬速度が異なっているから、二次高調波が効率よく発生しない。

2.6 位相整合条件

二次高調波を効率よく発生するために、位相整合条件を満たすことは重要である。

ここで、二次高調波は

$$\mathbf{E}_{2\omega} = \mathbf{E}_{IH} + c\mathbf{E}_H \quad (2.62)$$

となる。 c は境界条件によるものである。境界面は $z = 0$ とすると、

$$\mathbf{E}_{2\omega} = \mathbf{E}_{IH} + c\mathbf{E}_H = \mathbf{0} \quad (2.63)$$

となる。つまり、 $z = 0$ において、二次高調波は発生しない。

簡単のために、 x 方向の電場だけ論述する。 x 方向における強制振動と自由振動は、それぞれ

$$E_{IHx}(z, t) = \frac{1}{2}E_{2\omega} \exp(ik_s z - i2\omega t) \quad (2.64)$$

$$E_{Hx}(z, t) = \frac{1}{2}E_{2\omega}^+ \exp(ik_{2\omega}^+ z - i2\omega t) \quad (2.65)$$

となる。二次高調波は

$$\begin{aligned} E_{2\omega x} &= E_{IHx}(z, t) + cE_{Hx}(z, t) \\ &= \frac{1}{2} [E_{2\omega} \exp(ik_s z) + cE_{2\omega}^+ \exp(ik_{2\omega}^+ z)] \exp(-i2\omega t) \end{aligned} \quad (2.66)$$

となる。境界条件により、 $cE_{2\omega}^+ = -E_{2\omega}$ から、式 (2.66) は

$$\begin{aligned}
E_{2\omega x} &= \frac{1}{2} [E_{2\omega} \exp(ik_s z) - E_{2\omega} \exp(ik_{2\omega}^+ z)] \exp(-i2\omega t) \\
&= \frac{1}{2} E_{2\omega} \left(e^{\frac{i}{2}[k_s + k_{2\omega}^+ + k_s - k_{2\omega}^+]z} - e^{\frac{i}{2}[k_s + k_{2\omega}^+ - k_s + k_{2\omega}^+]z} \right) e^{-i2\omega t} \\
&= iE_{2\omega} \exp\left(i\frac{k_s + k_{2\omega}^+}{2}z\right) \frac{\exp\left(i\frac{k_s - k_{2\omega}^+}{2}z\right) - \exp\left(-i\frac{k_s - k_{2\omega}^+}{2}z\right)}{2i} e^{-i2\omega t} \\
&= iE_{2\omega} \exp\left(i\frac{k_s + k_{2\omega}^+}{2}z\right) \sin\left(\frac{k_s - k_{2\omega}^+}{2}z\right) \exp(-i2\omega t)
\end{aligned} \tag{2.67}$$

となる。その電場の強度は

$$\begin{aligned}
I_{2\omega x} &= |E_{2\omega x}|^2 \\
&= |E_{IHx}|^2 |E_{Hx}|^2 \sin^2\left(\frac{k_s - k_{2\omega}^+}{2}z\right) \\
&\propto \sin^2\left(\frac{\Delta k}{2}z\right)
\end{aligned} \tag{2.68}$$

となる。 $\Delta k = k_s - k_{2\omega}^+$ は位相差である。

強制振動の波数ベクトル k_s と励起電場の波数ベクトル k_ω は

$$k_s = 2k_\omega \tag{2.69}$$

となる。強制振動において

$$n_\omega \omega = ck_\omega \tag{2.70}$$

式 (2.6) より、

$$k_s = \frac{2n_\omega \omega}{c} \tag{2.71}$$

となる。自由振動において

$$k_{2\omega}^+ = \frac{n_{2\omega} 2\omega}{c} \tag{2.72}$$

となる。

位相整合条件は

$$\begin{aligned}\Delta k &= k_s - k_{2\omega}^+ \\ &= \left(\frac{2\omega}{c}\right)(n_\omega - n_{2\omega}) \\ &= 0\end{aligned}\tag{2.73}$$

となる。

ここで、注意すべきのは、 $\Delta k = 0$ のとき、数学的には、式 (2.53) の非線形波動方程式は、式 (2.59) の斉次解と式 (2.58) の非斉次解が同じようになる。 Δk は 0 に近づくときは、非線形波動方程式は斉次解と非斉次解をもつが、 $\Delta k = 0$ は別の解をもつ。その時の解は、以下のようなになる。

区別するために、改めて、入射光である基本波は \mathbf{E}_1 、非線形分極により発生した高調波 \mathbf{E}_2 、それぞれの周波数と波数ベクトルは ω_1 、 \mathbf{k}_1 と ω_2 、 \mathbf{k}_2 と考えてみよう。

z 方向に進むとすると、一次元非線形光学波動方程式は

$$\frac{\partial^2 E_2}{\partial z^2} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(E_2 + \frac{P_2^L}{\varepsilon_0} \right) = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} P_2^{NL}\tag{2.74}$$

と書ける。

$$P^{NL} = P^{(2\omega_1)} e^{-2i(\omega_1 t - k_1 z)} + c.c.\tag{2.75}$$

$$P^{(2\omega_1)} = \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)}(\omega_2 = \omega_1 + \omega_1) E_1^{(\omega_1)} E_1^{(\omega_1)}\tag{2.76}$$

$$E_2 = E_2^{(\omega_2)}(z, t) e^{-i(\omega_2 t - k_2 z)} + c.c.\tag{2.77}$$

$$E_2 + \frac{P_2^L}{\varepsilon_0} = \frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_0} E_2^{(\omega_2)}(z, t) e^{-i2(\omega_2 t - k_2 z)} + c.c.\tag{2.78}$$

とする。 ε_2 は ω_2 に対する誘電率である。その屈折率 $n_2 = \sqrt{\varepsilon_2/\varepsilon_0}$ である。式 (2.75)、(2.76)、(2.77)、(2.78) を式 (2.37) に代入すると

$$\left[ik_2 \frac{\partial E^{(\omega_2)}}{\partial z} - (-i\omega_2) \frac{\partial E^{(\omega_2)}}{\partial t} \right] e^{-i(\omega_2 t - k_2 z)} = (-4\omega_1^2) \mu_0 P^{(2\omega_1)} e^{-i2(\omega_1 t - k_1 z)}\tag{2.79}$$

となる。 $k_2 = n_2\omega_2/c$ 、 $\omega_1 = \omega_2/2$ と用いて式 (2.79) を整理すると

$$\begin{aligned}\frac{\partial E^{(\omega_2)}}{\partial z} + \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial E^{(\omega_2)}}{\partial t} &= i\mu_0\omega_2^2 P^{(2\omega_1)} e^{-i2(\omega_1 t - k_1 z) + i(\omega_2 t - k_2 z)} \\ &= i\mu_0\omega_2^2 \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)} [E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}] e^{-i(k_2 - 2k_1)z} \\ &= i\mu_0\omega_2^2 \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)} [E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}] e^{-i\Delta k z}\end{aligned}\quad (2.80)$$

となる。 $\Delta k = k_2 - 2k_1 = 0$ は位相整合条件である。

式 (2.80) の $E_2^{(\omega_2)}(z, t)$ は時間 t に関してゆっくり変化するため、式 (2.80) の時間微分はゼロになるから、高調波発生のは

$$\frac{\partial E^{(\omega_2)}}{\partial z} = i\mu_0\omega_2^2 \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)} [E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}] e^{-i\Delta k z}\quad (2.81)$$

となる。入射面 $z = 0$ から出射面 $z = l$ まで積分すると、出力の高調波電場は

$$\begin{aligned}E^{(\omega_2)} &= i\mu_0\omega_2^2 \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)} [E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}] \int_0^l e^{-i\Delta k z} dz \\ &= i\mu_0\omega_2^2 \varepsilon_0 \chi^{\leftrightarrow(2)} [E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}] \frac{e^{-i\Delta k l} - 1}{-i\Delta k}\end{aligned}\quad (2.82)$$

となる。

$$|E^{(\omega_2)}|^2 = \mu_0^2 \omega_2^4 \varepsilon_0^2 \left(\chi^{\leftrightarrow(2)}\right)^2 |E^{(\omega_1)} E^{(\omega_1)}|^2 \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k l}{2}\right) l^2\quad (2.83)$$

$$I_2 = \mu_0^2 \omega_2^4 \varepsilon_0^2 \left(\chi^{\leftrightarrow(2)}\right)^2 I_1^2 \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k l}{2}\right) l^2\quad (2.84)$$

ここで、sinc はシンク関数

$$\text{sinc} z = \frac{\sin z}{z}\quad (2.85)$$

である。結局、

$$I_2 \propto I_1^2\quad (2.86)$$

となる。高調波の強度 I_2 は基本波 I_1 の二乗に比例する。

位相整合条件を満たすとき、 $\Delta k = 0$ から、式 (2.84) の干渉項 $\text{sinc}^2(\Delta k z/2)$ は $z = 0$ で 1 となり、最大となる。各部分で発生した二次高調波の位相は全て揃え、振幅は各部分で発生する高調波の振幅の和となる。

ところが、一般に透明媒質では波長が短いほど屈折率が高い。つまり、正常分散となっている。 $\omega_2 > \omega_1$ に対しては $n_2 > n_1$ である。そこで、 $n_2 = n_1$ を得るために結晶の複屈折を用いる。図 2.5 に示すように、方解石を通して二重の像が見える。図 2.6 に示したのは常光線と異常光線の定義である。常光線と異常光線に対する屈折率 n_e 、 n_o が異なる。結晶の光学軸に対する入射角の関数である。 n_e と n_o を用いて結晶の SHG における位相整合角を計算できる。ここで、光学軸とは、ある特定の入射方向では複屈折を示さないときこの方向を結晶の光学軸という。図 2.5 の写真において、紙に対して方解石の角度を変えて、二重に見えなくなる方向は光学軸である。複屈折を示す結晶ではこの光学軸が 1 つの場合は単軸結晶、2 つの場合は二軸結晶という。

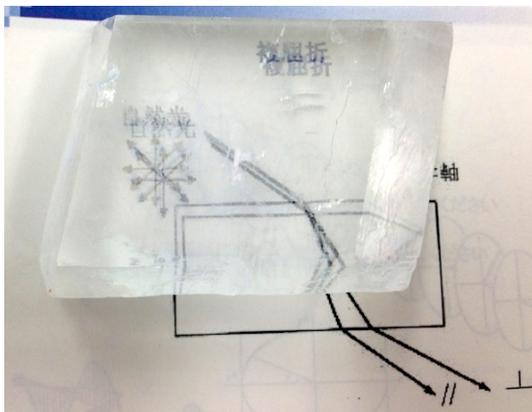


Fig. 2.5 方解石結晶による複屈折

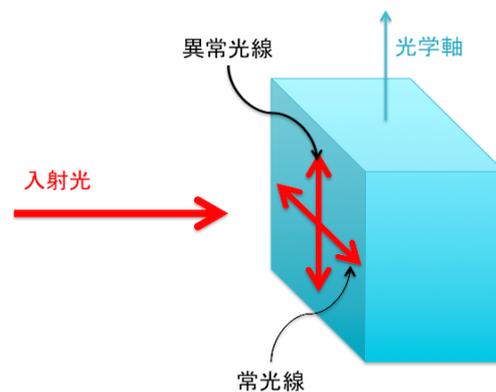


Fig. 2.6 常光線と異常光線

2.7 量子論における非線形光学

電磁波と相互作用するとき、原子の波動関数 $\Psi(\mathbf{r}, t)$ における Schrödinger 方程式は

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi = H\Psi \quad (2.87)$$

$$H = H_0 + H' = \frac{\tilde{\mathbf{p}}^2}{2m} = \frac{(\mathbf{p} - q\mathbf{A})^2}{2m} \quad (2.88)$$

$$H' = \frac{-2q\mathbf{p} \cdot \mathbf{A} + q^2 \mathbf{A}^2}{2m} \quad (2.89)$$

となる。 H_0 は原子のハミルトニアン、 H' は原子と電磁場と相互作用におけるハミルトニアンである。式 (2.89) の右辺で、第 2 項は第 1 項より十分小さいので省略できる。以下は第 1 項だけ計算する。 \mathbf{p} は原子の運動量演算子、 \mathbf{A} はベクトルポテンシャルである。原子の波動関数のオーダーで、 \mathbf{A} は常数と見なすことができる。

電子は電磁場と相互作用して、 n 状態から m 状態に遷移するとき、入射光の周波数と電子遷移の周波数が一致する場合

$$\begin{aligned} \langle n|H'|m\rangle &\approx -\frac{q}{m} \mathbf{A} \cdot \langle n|\mathbf{p}|m\rangle \\ &= -q\mathbf{E} \cdot \langle n|\mathbf{r}|m\rangle \\ &= -\mathbf{E} \cdot \langle n|\boldsymbol{\mu}|m\rangle \end{aligned} \quad (2.90)$$

である。ここで、 $\boldsymbol{\mu} = -q\mathbf{r}$ は双極子モーメント演算子、 $-\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}$ は電磁場と電気双極子と相互作用するエネルギーである。

次に、Schrödinger 方程式を解く。ここで摂動法を用いて方程式を解く。 $H' = 0$ のとき、Schrödinger 方程式は

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi = H_0 \Psi \quad (2.91)$$

となる。その解は

$$\Psi_n = U_n(\mathbf{r}) \exp\left(-\frac{iE_n t}{\hbar}\right) \quad (2.92)$$

となる。 $n = 1, 2, \dots$ である。式 (2.92) を式 (2.91) に代入すると

$$H_0 \Psi_n = E_n \Psi_n \quad (2.93)$$

が得られる。

$H' \neq 0$ のとき、方程式 (2.87) 式の解は、時間 t で展開して

$$\Psi(r, t) = \sum_n a_n(t) U_n(r) \exp\left(-\frac{iE_n t}{\hbar}\right) \quad (2.94)$$

となる。式 (2.94) を式 (2.87) に代入して、電磁場と電気双極子と相互作用するだけ考えると

$$\frac{da_k(t)}{dt} = \frac{1}{i\hbar} \sum_n \langle k|H'|n\rangle a_n(t) \exp(i\omega_{kn}t) \quad (2.95)$$

となる。 $\omega_{kn} \equiv \omega_k - \omega_n$ と定義する。 $a_n(t)$ を $a_k^{(s)}$ ($a_k^{(s)} \propto H'^{(s)}$) で展開すると

$$a_k = a_k^{(0)} + a_k^{(1)} + \cdots + a_k^{(s)} + \cdots \quad (2.96)$$

になる。 $a_k^{(0)}$ は常数である。入射光が弱いときは H' が小さいため、式 (2.96) は収束する。式 (2.96) を式 (2.95) に代入すると

$$\frac{da_k^{(s)}}{dt} = \frac{1}{i\hbar} \sum_n \langle k|H'|n\rangle a_n^{(s-1)} \exp(i\omega_{kn}t) \quad ; \quad s = 1, 2, \cdots \quad (2.97)$$

となる。

一方、入射光 \mathbf{E} が極めて大きいとき、式 (2.96) は収束しない。入射光 \mathbf{E} を

$$\mathbf{E} = \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p) \exp(-i\omega_p t) \quad (2.98)$$

とおくと

$$H' = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \sum_p \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p) \exp(-i\omega_p t) \quad (2.99)$$

$$H'_{kn} = \langle k|H'|n\rangle = -\boldsymbol{\mu}_{kn} \cdot \sum_p \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p) \exp(-i\omega_p t) \quad (2.100)$$

となる。式 (2.97) を時間で積分すると

$$\begin{aligned} a_k^{(s)} &= \frac{1}{i\hbar} \int_{-\infty}^t \sum_n H'_{kn} a_n^{(s-1)} \exp(i\omega_{kn}\tau) d\tau \\ &= \frac{i}{\hbar} \int_{-\infty}^t \sum_n \boldsymbol{\mu}_{kn} \cdot \sum_p \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p) \exp[i(\omega_{kn} - \omega_p)\tau] [a_n^{(s-1)}(\tau)] d\tau \end{aligned} \quad (2.101)$$

となる。初期値 $a_n^{(0)} = \delta_{ng}$ (g は基底状態を表す) を式 (2.101) に代入すると

$$a_m^{(1)} = \frac{1}{\hbar} \sum_p \frac{\boldsymbol{\mu}_{mg} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p)}{\omega_{mg} - \omega_p} \exp [i(\omega_{mg} - \omega_p)t] \quad (2.102)$$

となる。さらに、 $a_m^{(1)}$ を式 (2.101) に代入すると

$$a_n^{(2)} = \frac{1}{\hbar^2} \sum_{p,q} \sum_m \frac{[\boldsymbol{\mu}_{nm} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_q)] [\boldsymbol{\mu}_{mg} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p)]}{(\omega_{ng} - \omega_p - \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} \exp [i(\omega_{ng} - \omega_p - \omega_q)t] \quad (2.103)$$

が得られる。

原子波動関数の状態ベクトルとその共役ベクトルは

$$\begin{aligned} |\Psi^{(1)}\rangle &= \sum_m a_m^{(1)}(t) U_m(\mathbf{r}) e^{-i\omega_m t} \quad , \quad \langle \Psi^{(1)}| = \sum_m a_m^{(1)*}(t) U_m^*(\mathbf{r}) e^{i\omega_m t} \\ |\Psi^{(2)}\rangle &= \sum_m a_m^{(2)}(t) U_m(\mathbf{r}) e^{-i\omega_m t} \quad , \quad \langle \Psi^{(2)}| = \sum_m a_m^{(2)*}(t) U_m^*(\mathbf{r}) e^{i\omega_m t} \end{aligned} \quad (2.104)$$

となる。2次の双極子モーメント $\mathbf{p}^{(2)}$ は

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{p}^{(2)} \rangle &= \langle \Psi^{(0)} | \boldsymbol{\mu} | \Psi^{(2)} \rangle + \langle \Psi^{(1)} | \boldsymbol{\mu} | \Psi^{(1)} \rangle + \langle \Psi^{(2)} | \boldsymbol{\mu} | \Psi^{(0)} \rangle \\ &= \frac{1}{\hbar^2} \sum_{p,q} \sum_{m,n} \left\{ \frac{\boldsymbol{\mu}_{gn} [\boldsymbol{\mu}_{nm} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_q)] [\boldsymbol{\mu}_{mg} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p)]}{(\omega_{ng} - \omega_p - \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} \right. \\ &\quad + \frac{[\boldsymbol{\mu}_{gn} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_q)] \boldsymbol{\mu}_{nm} [\boldsymbol{\mu}_{mg} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p)]}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} \\ &\quad \left. + \frac{[\boldsymbol{\mu}_{mg} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_q)] [\boldsymbol{\mu}_{nm} \cdot \tilde{\mathbf{E}}(\omega_p)] \boldsymbol{\mu}_{mg}}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg}^* + \omega_p + \omega_q)} \right\} e^{-i(\omega_p + \omega_q)t} \end{aligned} \quad (2.105)$$

となる。また、2次の非線形分極 $\mathbf{p}^{(2)}$ は

$$\mathbf{P}^{(2)} = N \langle \mathbf{p}^{(2)} \rangle = \sum_r \mathbf{p}^{(2)}(\omega_r) e^{-i\omega_r t} \quad (2.106)$$

$$P_i^{(2)}(\omega_p + \omega_q, \omega_p, \omega_q) = \varepsilon_0 \sum_{j,k} \sum_{p,q} \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_p + \omega_q, \omega_p, \omega_q) E_j(\omega_r) E_k(\omega_r) \quad (2.107)$$

と定義されている。2次の電気感受率は

$$\begin{aligned}
\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_p + \omega_q, \omega_p, \omega_q) = & \\
\frac{N}{\hbar^2} \sum_{m,n} & \left[\frac{\mu_{gn}^{(i)} \mu_{nm}^{(j)} \mu_{mg}^{(k)}}{(\omega_{ng} - \omega_p - \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} + \frac{\mu_{gn}^{(i)} \mu_{nm}^{(k)} \mu_{mg}^{(j)}}{(\omega_{ng} - \omega_p - \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} \right. \\
& + \frac{\mu_{gn}^{(j)} \mu_{nm}^{(i)} \mu_{mg}^{(k)}}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} + \frac{\mu_{gn}^{(k)} \mu_{nm}^{(i)} \mu_{mg}^{(j)}}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg} - \omega_p)} \\
& \left. + \frac{\mu_{gn}^{(j)} \mu_{nm}^{(k)} \mu_{mg}^{(i)}}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg}^* + \omega_p + \omega_q)} + \frac{\mu_{gn}^{(k)} \mu_{nm}^{(j)} \mu_{mg}^{(i)}}{(\omega_{ng}^* + \omega_q)(\omega_{mg}^* + \omega_p + \omega_q)} \right] \quad (2.108)
\end{aligned}$$

となる。

式(2.108)からわかるように、ポンプ光の周波数 ω_p は ω_{mg} に接近するとき、共鳴が強くなり、2次の電気感受率 $\mathbf{P}^{(2)}$ が大きくなる。[33]

第3章 フェムト秒パルスレーザーを用いた非線形光学顕微鏡

3.1 フェムト秒パルスレーザー

本研究で用いたフェムト秒レーザーパルスの時間幅は約 100 fs である。光は 1 s で地球の七周半を進むことができるが、100 fs でわずか 30 μm の距離しか進めない。また、わずか 100 mJ のレーザー出力エネルギーを 100 fs に集中したら 10^{12} W のピークパワー出力が得られる。さらに、レンズでビームを集光して、例えば、直径 10 μm に絞ると、ピークパワー密度は 10^{18} W/cm² に達する。光強度 I と電場 E の関係は

$$I = \frac{1}{2} \frac{c}{n} \varepsilon E^2 \quad (3.1)$$

である。ここで、 c は光速、 n は屈折率、 ε は誘電率である。また、光強度 I と電場 E の換算式は

$$I = 1.3 \times 10^{-3} E^2 \quad (3.2)$$

となる。ここで、光強度 I の単位は W/cm²、電場 E の単位は V/cm である。ここで、 10^{18} W/cm² のピークパワー密度を電場に換算したら 3×10^{10} V/cm となり、物質の破壊電界に匹敵する。このような光を用いて原子から直接に電子を取り除くことができる。

本研究では短時間かつ低入射パワーで SHG を観察するため、高効率に SHG を得ることが非常に重要である。フェムト秒パルスはピークパワーが極めて高い。図 3.1 に示すように、同じエネルギーをもつパルスは、パルス幅が短ければ短いほどピークパワー（瞬時強度）が高い。SHG の強度は入射光強度の二乗に比例するので、同じエネルギーであれば、パルス幅が短いほうが SHG の強度が高い。

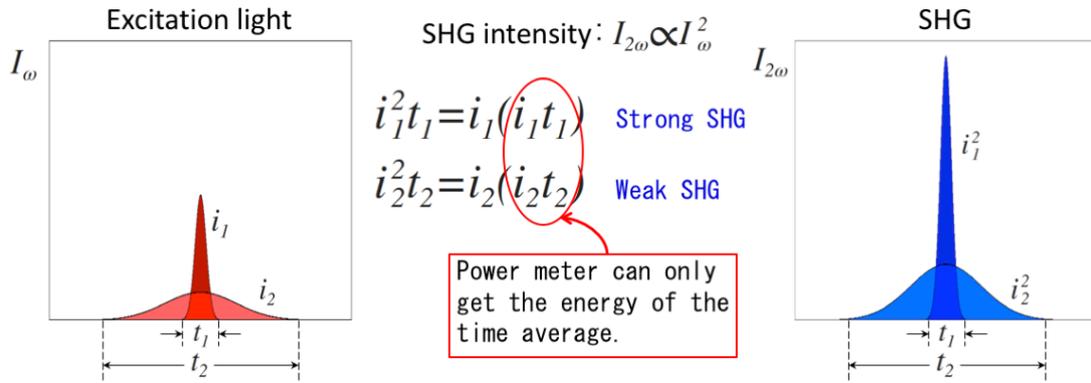


Fig. 3.1 SHG の強度と入射光パルスのピークパワーの関係

$$I = \frac{P}{A} \quad (3.3)$$

$$\begin{aligned} I_{\text{SHG}} &\propto f_{\text{PRF}} \left(\frac{P}{A} \right)^2 \tau_p \\ &= f_{\text{PRF}} \left(\frac{E}{\tau_p A} \right)^2 \tau_p \\ &= f_{\text{PRF}} \left(\frac{E}{A} \right)^2 \frac{1}{\tau_p} \end{aligned} \quad (3.4)$$

ここで、 I_{SHG} は SHG の強度、 f_{PRF} はパルスの繰り返し周波数、 P はパルスのパワー、 E は一つのパルスのエネルギー、 A はビームのスポット面積、 τ_p はパルス幅である。SHG の強度 I_{SHG} は、 f_{PRF} 、 E 、 A 、 τ_p に依存する。フェムト秒パルスを用いれば、低い入射パワーでも高効率に SHG を得ることができる。

光パルスの時間波形とスペクトル形状は互いにフーリエ共役の関係にある。時間幅の半値全幅は Δt 、エネルギーの半値全幅は ΔE とすると

$$\Delta t \cdot \Delta E \geq h \quad (3.5)$$

の不確定性関係が成立する。ここで、 h はプランク定数である。等号をとるときは、パルス光に含まれる各周波数成分は全て同位相（モードロック）になり、時間的に

最短のパルスができる。このようなパルスはフーリエ変換限界パルス (Transform-Limited Pulse, TLP) という。

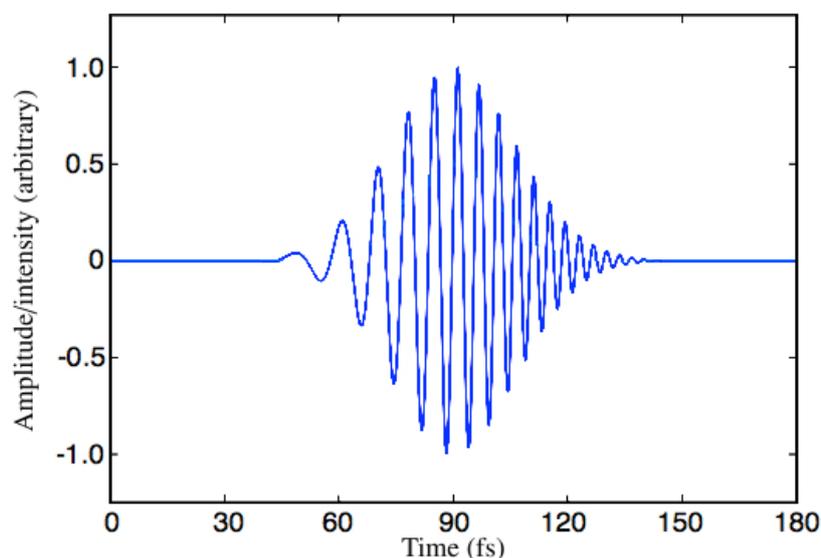


Fig. 3.2 時間領域におけるパルス

図 3.2 に示すように、周波数が時間的に変化していくことを「チャープ」と呼んでいる。小鳥の鳴き声の音程が変化していることに似ている。フェムト秒パルスレーザーは時間方向に光強度の変化が非常に激しい。位相速度はパルスのピーク付近で遅くなる。パルスはある物質に入射するとき、パルスの立ち上がり部分の波長は長くなり、後半の部分の波長は短くなる。周波数のスペクトル幅が急激に広がる。この現象は自己位相変調という。特に、イオン化ポテンシャルの高い希ガスやバンドギャップが大きい固体（液体）では、自己位相変調が発生しやすい。周波数スペクトルは紫外から赤外までの連続で超広帯域なスーパーコンティニューム (Supercontinuum, SC) 光が生成する。本研究において、SC 光が発生すると、SHG 光と区別できなくなってしまうので、SC 光の発生を極力避ける。詳細な方法は、3.2.1 節の「非線形光学顕微鏡」で述べる。

3.1.1 フェムト秒パルスレーザーシステムの構造

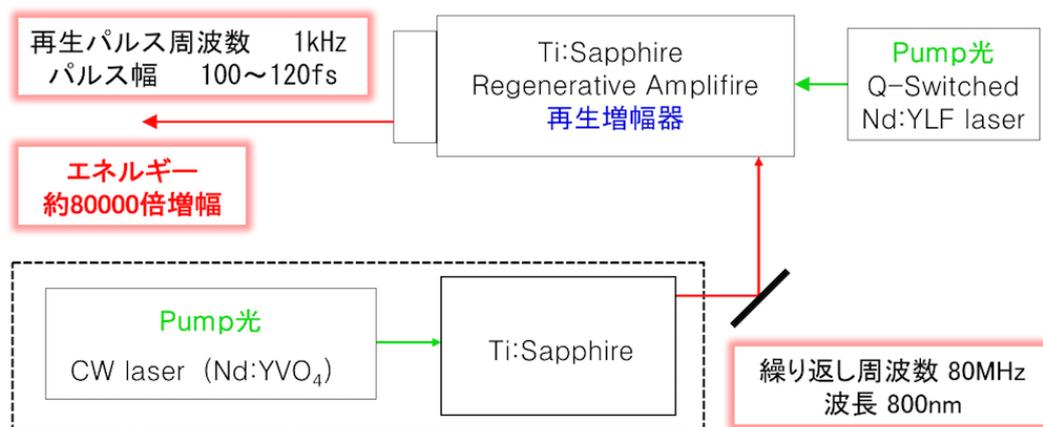


Fig. 3.3 フェムト秒パルスレーザーシステムのセットアップ

図 3.3 に示すのはフェムト秒パルスレーザーシステムのセットアップである。左下のポンプ光は Nd:YVO₄ (ネオジウム添加バナジウム酸イットリウム) レーザーである。ファイバーカップルされた半導体レーザーで励起されて、1064 nm の波長で発振するが、外部共振器で LBO 結晶で波長変換を行い、出力は波長 532 nm の連続波 (CW) である。通常は、5 W の出力パワーでチタンサファイアレーザーを励起する。カーレンズモードロックと呼ばれる一種の受動モード同期の方法でパルス光を発生する。発生したパルスは繰り返し周波数は 80 MHz、波長は 800 nm に設定した。

次に、物質と相互作用させるためにピークパワーを増幅しなければならない。右上のポンプ光はパルス再生増幅器の励起する Nd:YLF レーザーである。Nd:YLF レーザーの増幅媒質は、Yttrium Lithium Fluoride (YLiF₄) に Nd³⁺ をドープしたものである。Q スイッチで 1 kHz のパルスが発生し、発振波長は 1053 nm で、共振器内部 SHG の方式で波長 527 nm で出力する。出力パワーは 8.6 W でチタンサファイアレーザーを励起し、繰り返し周波数 80 MHz のシード光パルスを増幅する。ピークパワーを 80000 倍に増幅する。レーザー共振器の品質は共振器の中で共振している光が減衰する度合いである。そこで、Q スイッチ法では非常に多数の原子が励起状態になるまで共振器をオフ (Q 値を低く) にして発振を抑え、そして非常に短い時

間で共振器をオン（急に Q 値を高く）にして、ジャイアントパルス (Giant Pulse) が得られる。これで再生増幅して、最終的に、フェムト秒パルスレーザーシステムから出力する光は、波長 800 nm、繰り返し周波数 1 kHz、パルス幅約 100 fs のパルスである。

3.1.2 チタンサファイアモード同期レーザー

図 3.4 に示すようにチタンサファイアモード同期レーザーの構造である。

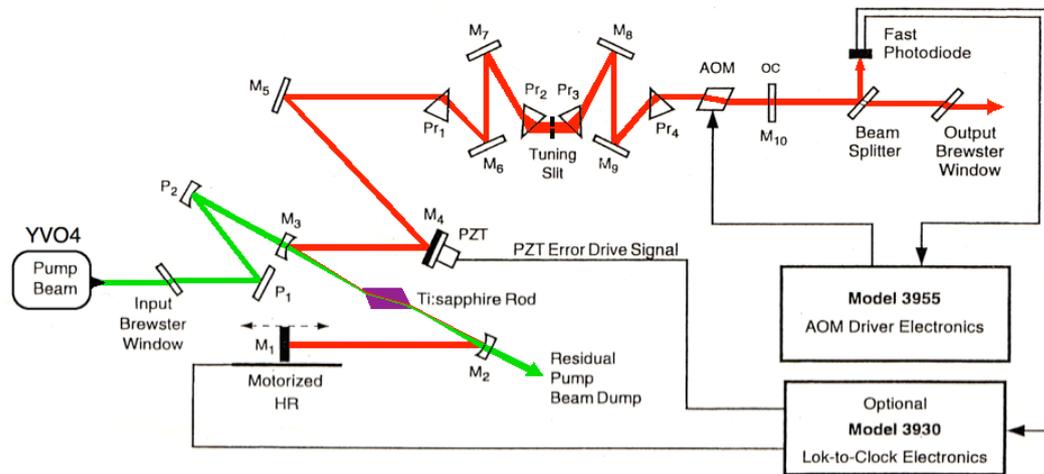


Fig. 3.4 チタンサファイアモード同期レーザー

Nd:YVO₄ レーザーをポンプ光としてチタンサファイアレーザーを励起する。音響光学素子 (Acousto-Optic Modulator, AOM) と可飽和吸収体を組み合わせ、共振器の縦モードを同期して発振させる。連続波 (CW) の出力に対して光スイッチ (AOM) を設置し、光スイッチでオン・オフを繰り返せば、光のパルスが生成される。

パルスの伝搬速度 (群速度) が波長によって異なり、周波数に依存して群速度が変化することは群速度分散という。このチャープを補償するためにプリズムを組み合わせている。図 3.4 に示すように、一対のブリュースタープリズムを向き合う面を平行に設定し、プリズム間の距離や挿入量を変えることでチャープ補償することができる。そして、もう一つのプリズム対を用いて、補償した光をもとのビームの

形に戻すことができる。プリズム対間にスリットを設置し、波長選択ができる。

リニアダイオードアレイを用いて出力の光のスペクトルを検出する。リニアダイオードアレイ（Linear Diode Array, LDA）とは、複数のフォトダイオードを並べたものである。各フォトダイオードは約波長幅1 nmの単色光を検出する。各単色光を電気信号に変換し、スペクトルが得られる。リニアダイオードアレイを用いて、パルスのスペクトルを検出し、モードロックしたかどうかを確認する。図3.5はモードロックがかかっている状態、図3.6はモードロックをかけていない状態である。

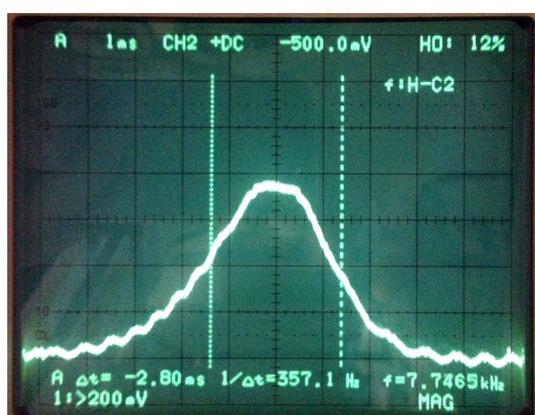


Fig. 3.5 モードロックがかかっている状態

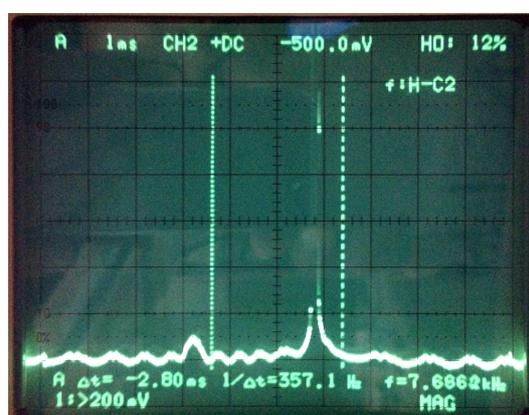


Fig. 3.6 モードロックがかけていない状態

次に、ロングパスフィルターで波長をチェックした。一枚のロングパスフィルターでリニアダイオードアレイの検出窓の前に入れることによって、スペクトル強度の変化を比較して波長をチェックすることができる。図3.7はフィルターの透過率を示す。図3.8はフィルターを入れる前後の合成した写真である。図3.8の場合は、フィルターの透過率を用いて計算した結果は中心波長は800 nm となっている。

3.1.3 モード同期

連続発振しているとき、レーザー媒質から発生するレーザー光の周波数成分は独立に発振している。一つの周波数成分は一つの縦モードと呼ぶ。各周波数成分は共振器内で定在波が立ち、すべての縦モードの位相を揃えた状態をモード同期という。

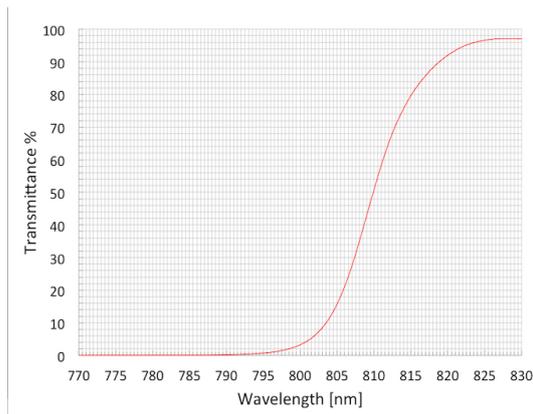


Fig. 3.7 ロングパスフィルターの透過率

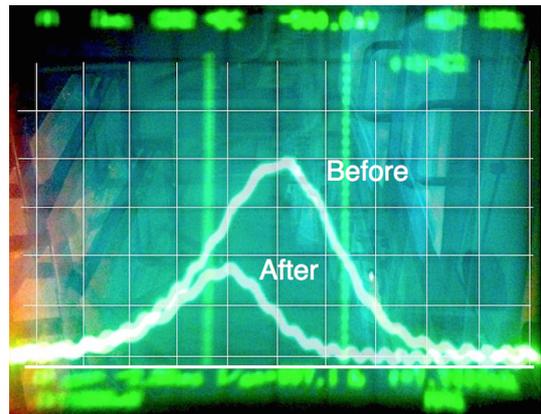


Fig. 3.8 スペクトル強度の変化

各縦モードの間隔 $\Delta\nu$ は

$$\Delta\nu = \frac{c}{2L} \quad (3.6)$$

である。 c は光速、 L は共振器長である。

モードロックは能動モード同期と受動モード同期がある。能動モード同期は、共振器内に光変調器で縦モードの間隔 $\Delta\nu$ を外部から変調する方法である。例えば、AOMに周波数 F の超音波を加えると内部に粗密波の回析格子が生成する。この格子に周波数 f の光を入射すると、入射光は加えた超音波の周波数 F の整数倍だけシフトする。すべての縦モードが同じ間隔を保ち、位相が揃ったら、モード同期状態が得られる。受動モード同期は、入射光強度に対して吸収係数が非線形に変化する可飽和吸収体などを共振器内に挿入して受動的にモード同期ができる。カーレンズモード同期は受動モード同期の一つである。

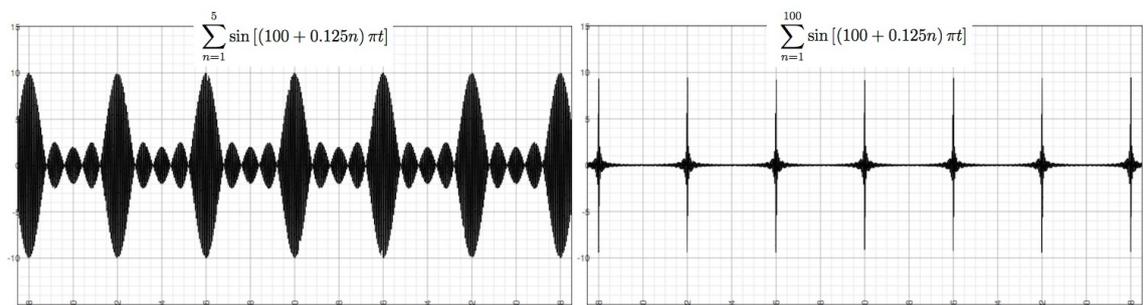


Fig. 3.9 モード同期のイメージ

モード同期のイメージとしては図 3.9 に示すように、一つのモードは一つの波長

(一つの t のサイン関数) に対応して、波長が異なる各モードの位相が揃ったら (サイン関数の和をとる) パルスができる。 n はモードの数である。モードの数が多いほどパルスの時間幅が小さい。

3.1.4 自己集束とカーレンズ効果

1964 年ごろ、ロチェスター大学光学研究所 (Institute of Optics, University of Rochester) の M. Hercher はルビーレーザーの光路内にガラスを挿入し、ビームが非常に強いとき、ガラス中に一連の小さな穴が直線になったような損傷ができことを発見した [34]。Townes はロチェスター大学光学研究所に訪問したとき、この結果を聞いてその原因は自己捕獲 (Self-Trapping) であると考えた [35]。実は、自己捕獲について、1962 年、Askaryan はすでに自己捕獲の理論を提出していた [36]。

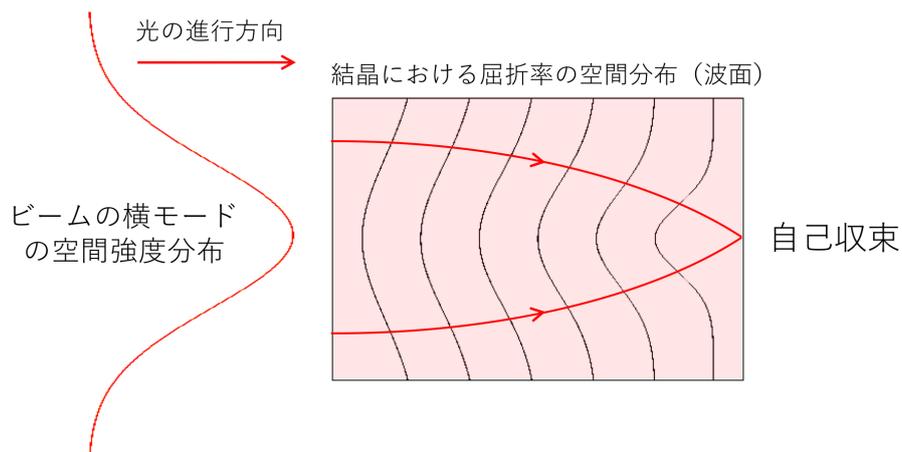


Fig. 3.10 カーレンズ効果による自己収束

光は屈折率 n の物質の中で進むとき、速度は真空中の速度の $1/n$ となる。屈折率が異なる物質の界面を斜めに通過するとき、進行方向も変わる。通常、屈折率は常数として取り扱う。しかし、光の強度が強いと、屈折率は通過する光の強度の関数となる。

$$n = n_0 + n_1 |E| + \frac{1}{2} n_2 |E|^2 \quad (3.7)$$

1 次の項はポッケルス効果、2 次の項はカー効果である。通過する光の強度が高ければ、屈折率は大きい。一般のレーザービーム断面の強度分布はガウス分布である。

図 3.10 に示すように、ビーム中心の強度が強く（進む速度が遅い）、周囲の強度が弱い（進む速度が速い）と、凸レンズを通過するのと同じ効果であり、自己収束 (Self-focusing) が起こる。光強度が強ければ強いほど焦点は近く、逆に弱ければ弱いほど焦点は遠い。一方、集光されたビームの収束径が波長に近くなると、回折効果によってビームが広がっていく。自己収束と回折による広がりが釣り合い、一定のビーム径を保ちながらビームが媒質中を伝播するを自己束縛 (Self-trapped) と呼ぶ。しかし、自己束縛は非常に不安定な現象で、極めて特定な条件が必要である。例えば、光のエネルギー、光の散乱や吸収などの条件のわずかな変化があれば、自己収束と回折による広がりの釣り合いがすぐ崩れてしまう。実は、上述のルビーレーザーの光路内のガラスに観察された直線のようなダメージは自己収束によるものである。ルビーレーザーによるジャイアントパルス波における光強度は時間とともに変化する。よって、自己収束の焦点位置も時間とともに変化する、移動焦点 (Moving Focus) になる。

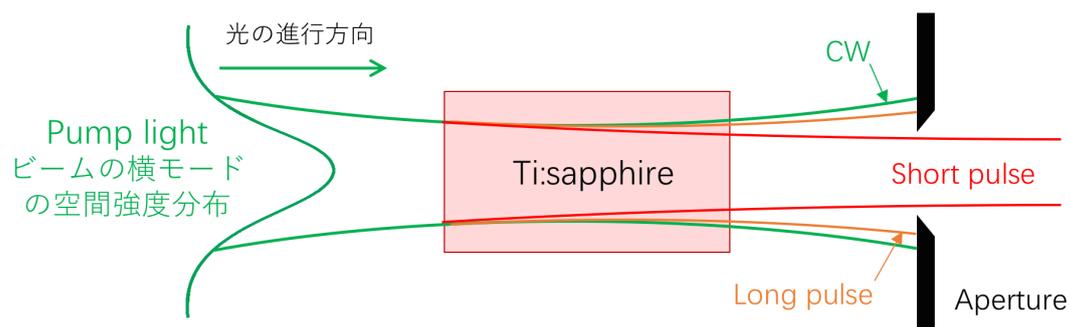


Fig. 3.11 カーレンズモード同期

カーレンズモード同期は、チタンサファイア自身のもつ光非線形効果であるカー効果を用いる方法である。図 3.11 に示すように、チタンサファイアはモードロッカーとして、入射光強度が強いときだけ、カーレンズによって収束したビームがアパーチャーを通過できる。ピークパワーの高いパルスだけ、選択発振することができる。

3.1.5 パルス再生増幅器

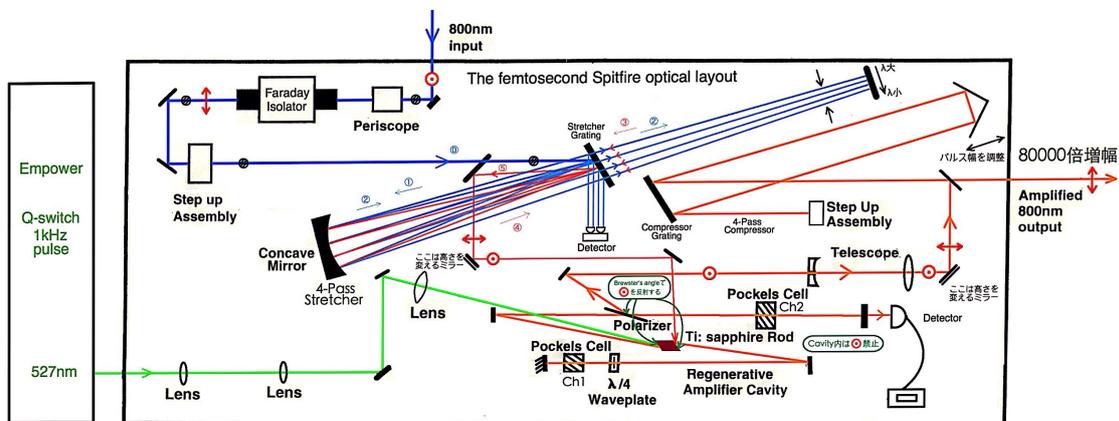


Fig. 3.12 パルス再生増幅器

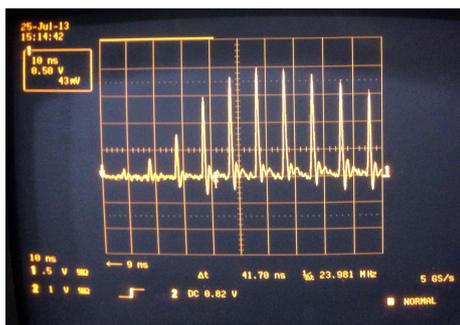


Fig. 3.13 増幅されたパルスの信号

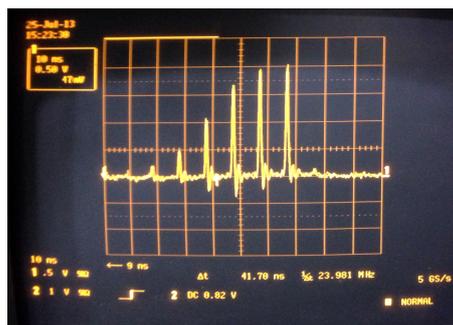


Fig. 3.14 飽和したところの信号

図 3.12 に示すのはパルス再生増幅器のセットアップである。パルス再生増幅器は増幅器内の Ti:sapphire レーザーからの高いピークパワーを得るためにパルスを増幅し、単位時間あたりのパルス数を減らす装置である。この方法はチャープパルス増幅といい、3.1.6 節で詳しく説明する。まず、フェムト秒パルスの幅を広げて、シード光とし、増幅器に入射させる。増幅器のキャビティーは Z 字となっている。シード光を Z 字キャビティーで繰り返して増幅される。図 3.13 は増幅する回数によって、増幅されていくパルスの信号である。左から 1 番目の信号は 1 回増幅した結果、2 番目の信号は 2 回増幅した結果、段々飽和していく。飽和したらパルスのピークパワーが 80000 倍に増幅されたこととなる。飽和したパルスを用いたの

で、ポッケルスセルによる操作で(3.1.7節で詳しく説明する)増幅器から放出する。図3.14は飽和したところの信号を取り出すことを示している。取り出したパルスを再びフェムト秒レベルに圧縮して出力する。

3.1.6 チャープパルス増幅

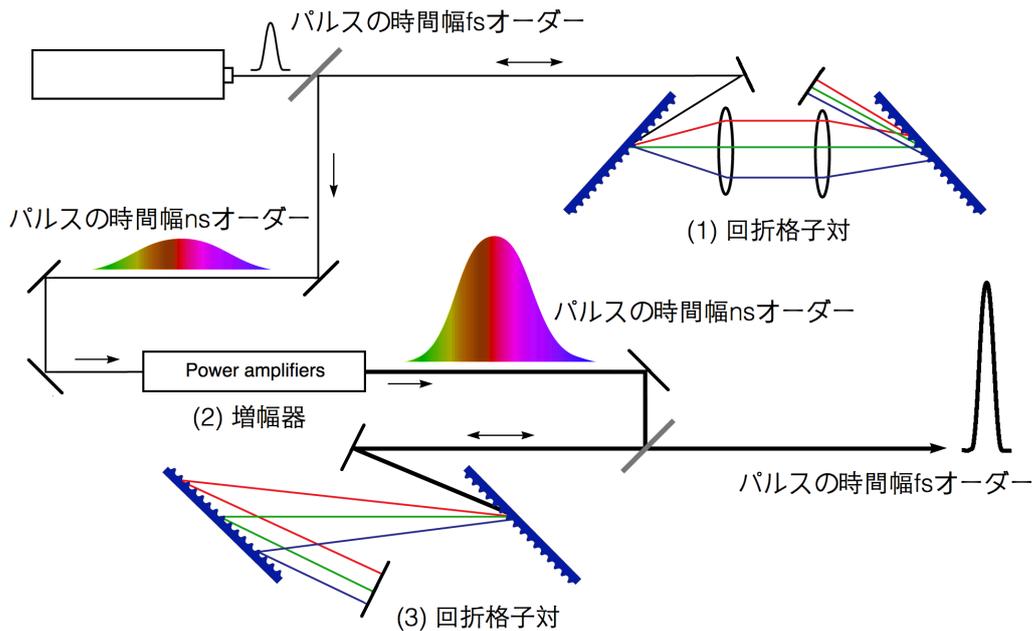


Fig. 3.15 チャープパルス増幅の基本セットアップ。増幅する前に、フェムト秒パルスの種光を(1)の回折格子対で光路差を作ってパルス幅を延伸する。延伸されたパルスを(2)の増幅器で増幅する。増幅した後、もう一つの(3)の回折格子対で増幅されたパルスの幅をフェムト秒オーダーまで圧縮する。

フェムト秒パルスレーザーから発生したパルスの、一つのパルス中の最大のピークパワーは約 10^5 W である。物質と相互作用するにはこのピークパワーではまだ足りない。もっと高いピークパワーを得るためにパルスを増幅しなければならない。しかし、問題はパルスのピークパワーが強すぎて、増幅する際に非線形効果が発生し増幅器を破壊することである。80年代、D. Strickland と G. Mourou がチャープパルス増幅 (Chirped Pulse Amplification, CPA) を提出し [37]、この問題を解決した。図 3.15 に示すのが、CPA の基本セットアップである。増幅する前に、フェムト秒パルスを約ナノ秒オーダーまで広げる。パルスのピークパワーも同時に約 4 桁

低減される。この広いパルスは増幅媒質を通過するとき、エネルギーを十分得られるし、非線形効果も抑える。増幅した後、広いパルスを再びフェムト秒レベルに圧縮する [38]。一般の再生増幅器では、 10^{18} W/cm² の非常に高いピークパワー密度が得られる。この強度は電場強度に換算すると、原子内部の電子に働くクーロン場の強度に匹敵する。

3.1.7 ポッケルスセル

ポッケルスセルではポッケルス効果を用いて偏光方向を回転させることができる。物質の屈折率が物質にかかる電場の強度に比例することをポッケルス効果と呼ぶ。下式の1次の項はポッケルス効果を表わす。

$$n = n_0 + n_1 |E| + \frac{1}{2} n_2 |E|^2 \quad (3.8)$$

図 3.16 に示すように、ポッケルスセルに電圧をかけると圧電性のある等方性結晶の屈折率が変化し、結晶に入射した直線偏光は楕円偏光に変換される。次に、 $1/4$ 波長板で楕円偏光を直線偏光に変換する。このときの直線偏光は結晶を通過する前の直線偏光と直交していて、出射側の偏光子を通過することができる。一方、電圧で出射側の偏光子と直交するような偏光方向に選ぶと、光が遮断されることになる。つまり、ポッケルスセルは電圧制御型波長板とみなすことができる。このように、電圧で偏光を制御することで光を高速的にスイッチングすることができる。

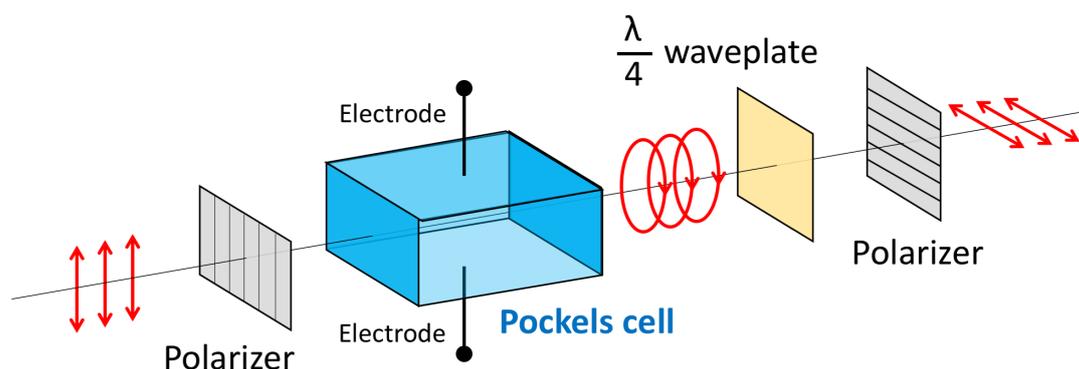


Fig. 3.16 ポッケルスセルの動作原理

3.1.8 パルス幅の測定

超短光パルスによる電磁場の変化は非常に高速な現象であるため、直接パルスの時間幅を測定することは困難である。そこで自己相関法を用いてパルスの時間幅を測定することができる。その測定装置はオートコリレーターと呼ばれる。

図3.17は、自己相関法を用いたパルスの時間幅を測定する原理である。入射ビームはビームスプリッターで二つに分けられ、一方のミラーは光学距離（時間）の調整ができるようになっている。ミラーから反射してきた二つのパルスはビームスプリッターで重なる。遅延を制御することで重ねられたパルスの強度を調整できる。この重ねられたパルスを2次の非線形光学結晶で発生するSHGを用いてパルスを測定する。SHGの強度は入射光強度の二乗で決まる。SHGの強度からパルスの重なり度合いが計算できる。時間差はSHG強度の関数となる。

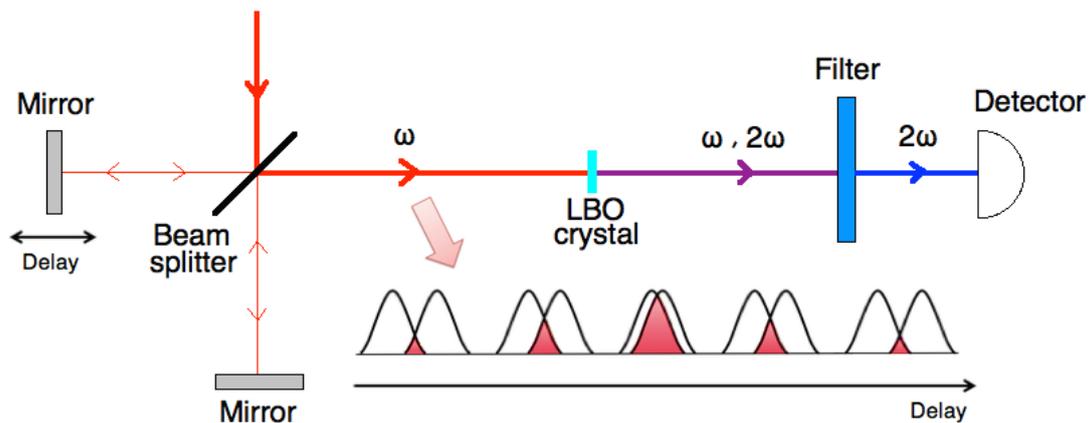


Fig. 3.17 自己相関法を用いてパルスの時間幅を測定する原理

図3.18に示すように、時間差（光路差）とSHG強度の関係をプロットした自己相関波形 $G(\tau)$ は以下の式で与えられる。

$$G(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} I(t) I(t - \tau) dt \quad (3.9)$$

本実験で用いたオートコリレーターは自己相関の原理を利用したものであるが、セットアップが図3.17とは多少異なっている。図3.19に示したのは本実験で用いたオートコリレーターである。入射したビームは1:1のビームスプリッターにより二

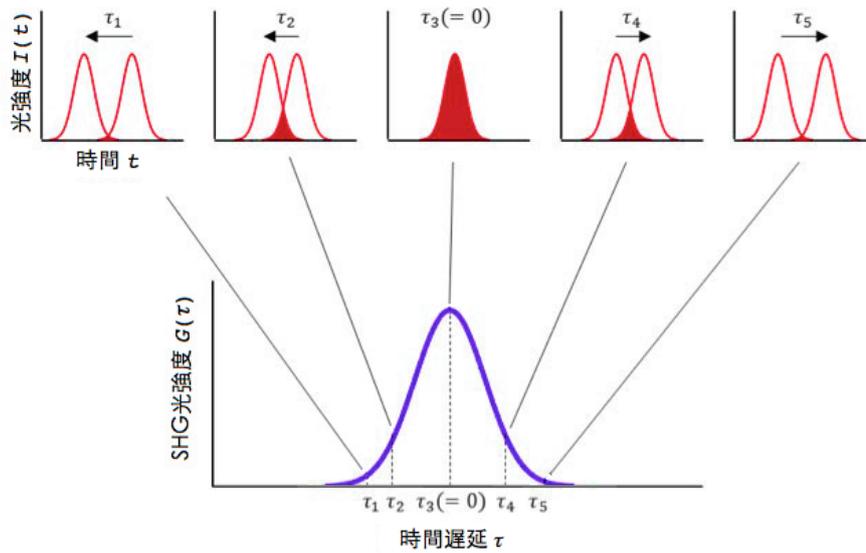


Fig. 3.18 自己相関法を用いてパルスの時間幅を測定する原理

つに分けられる。一方のビームは可変ディレイライン（Variable delay line）によって遅延をかける。分けられた光は非線形光学結晶中に入射し、結晶の中で重ねられる。位相整合条件が揃ったら SHG 光は発生する。

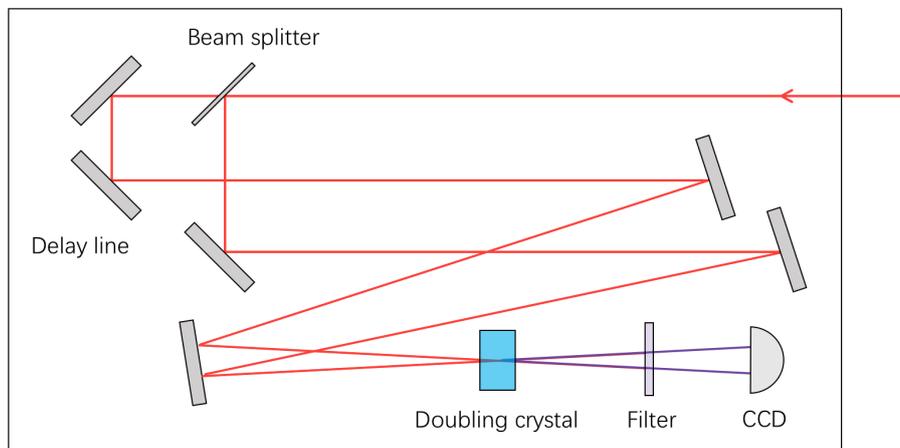


Fig. 3.19 本実験で用いた周波数分解光ゲート法（FROG）オートコリレーター

図 3.20 に示すように、周波数分解光ゲート法（Frequency resolved optical gating, FROG）では、レーザーパルスを二つに分け、一方の光路に遅延をかける。二つのレーザーパルスは非線形光学結晶に集光され、入射される。非線形光学結晶より発

生じた SHG 信号を検出する。SHG の強度が二つのパルス間の遅延時間の関数として測定される。ディレイラインの遅延時間と SHG 信号スペクトルの関係を描画することによって、スペクトログラムが得られる。さらに、フーリエ変換とフーリエ逆変換でパルスの時間幅を計算できる。

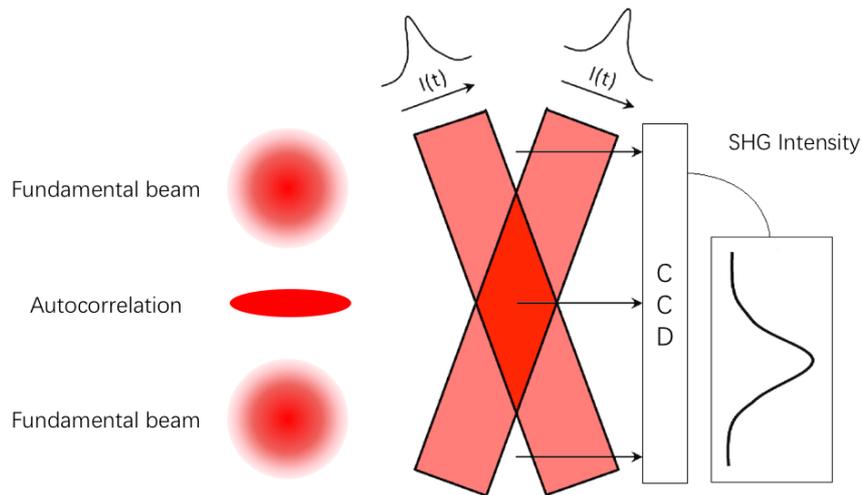


Fig. 3.20 パルスの時間幅を測定する方法

図 3.21 は、実際に検出したパルスの時間幅である。その半値全幅 (FWHM) は約 100 fs である。

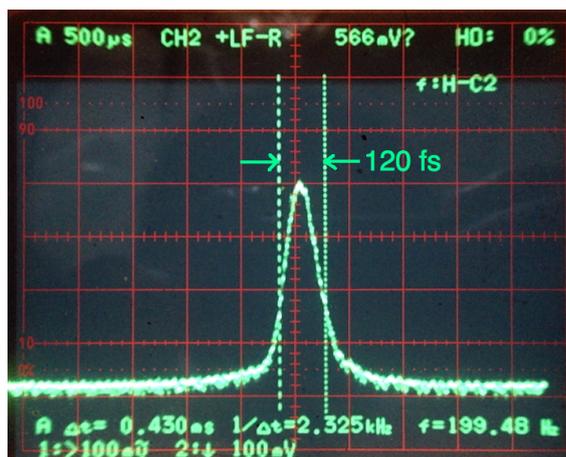


Fig. 3.21 実際に検出したパルスの時間幅

3.2 非線形光学顕微鏡システム

3.2.1 非線形光学顕微鏡

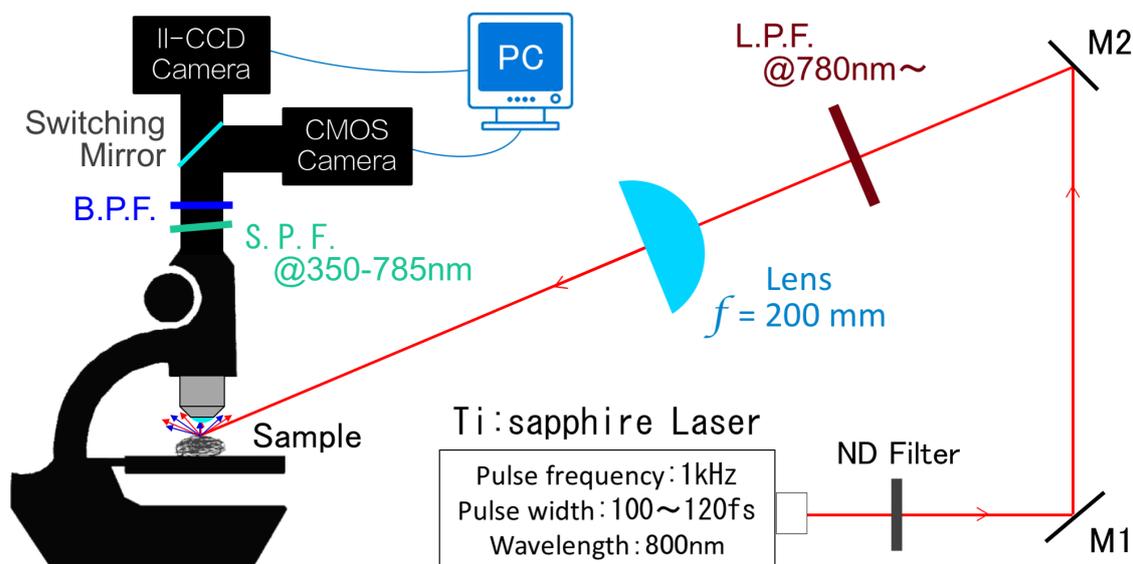


Fig. 3.22 非線形光学顕微鏡

図 3.22 は、非線形光学顕微鏡の全体図である。光源は繰り返し周波数 1 kHz、パルス幅約 100 fs、波長 800 nm の光パルスである。この光を ND (Neutral Density) フィルターでパワー調整する。焦点距離が 200 mm のレンズでビームをサンプルに集光する。レンズの次に 780 nm 以下の波長をカットするフィルター (Long Pass Filter, L.P.F [図 3.23(a)]) を置き、800 nm の入射ビームだけ通過させる。図 3.26 に示すように、散乱法でサンプルを観察する。サンプルにダメージを与えないように、入射ビームの焦点から少しずらした部分を使用した。入射ビームの横モード (断面の強度分布) はガウス分布となっていて円形である。斜めから入射するとサンプルに照射した光は同じくガウス分布であるが、形は楕円となっている。顕微鏡システムは OLYMPUS BX60 を使用した。試料から発生した SHG を対物レンズ ($\times 5$, $NA=0.15$; $\times 20$, $NA=0.46$) で観察する。対物レンズの次に 350-785 nm の波長を通過できるフィルター (Short Pass Filter, S.P.F. [図 3.23(b)]) を入れ、800 nm の入射光をカットする。バンドパスフィルター (Band Pass Filter, B.P.F. [図 3.23(c)(d)]) で観察したい波長を選択する。最後に II-CCD (Image Intensified - Charge Coupled

Device, Manufacturer : HAMAMATSU, model number : PMA-100) カメラで信号を検出する。また、白色光照明におけるリアルタイムの顕微像は、CMOS カメラ (Manufacturer : Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像する。

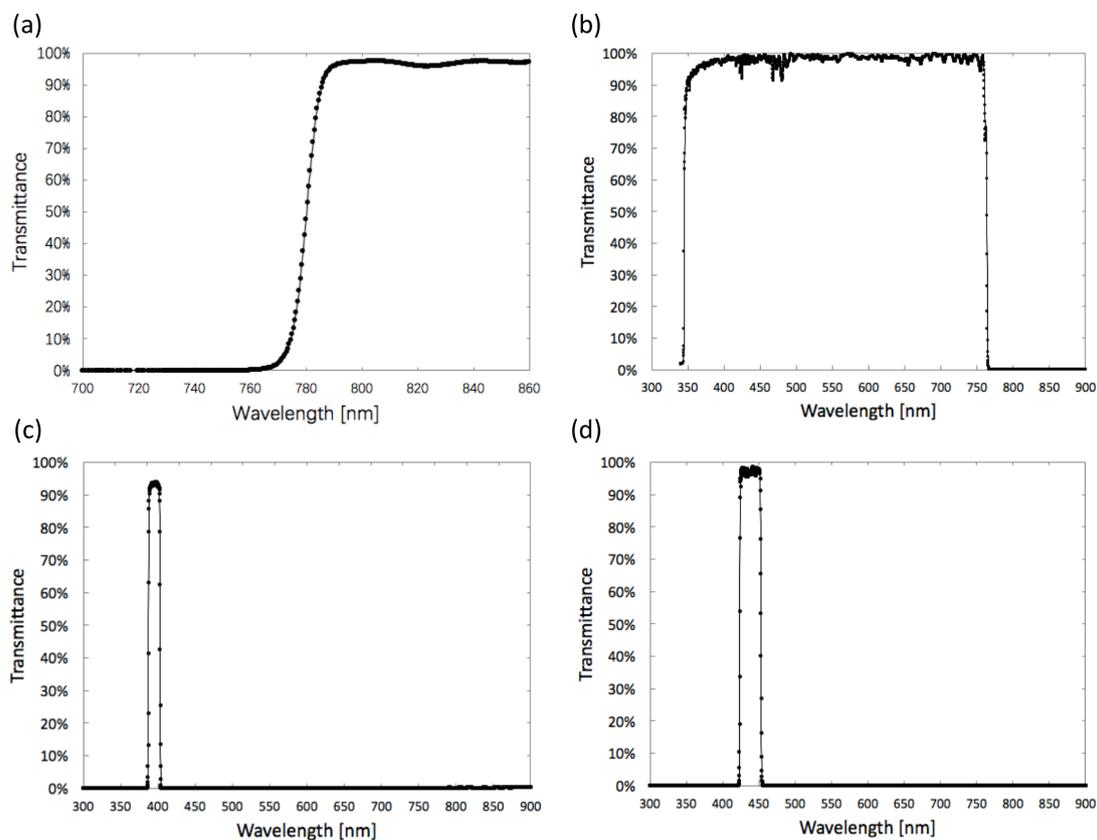


Fig. 3.23 各フィルターの波長領域における透過率。(a) Asahi Spectra long wavelength pass filter (L.P.F.) LI0780. (b) Semrock short wavelength pass filter (S.P.F.) BSP01-785R. (c) Semrock bandpass filter (B.P.F.) FF01- 395/11. (d) Semrock bandpass filter (B.P.F.) FF02- 438/24.

3.2.2 光学フィルターによる“ゴースト”の防止

本研究で開発した非線形光学顕微鏡において、波長を選択する光学フィルターの透過率と設置は非常に重要である。図 3.22 に示すように、ショートパスフィルターは光軸に対して垂直でない配置をした。バンドパスフィルターとショートパスフィルターは光軸に対して垂直に配置すると、二枚のフィルターの間で干渉が起こりやすい。その干渉によって II-CCD 出力に“ゴースト”が出てしまう場合がある。図

3.24(b) は実際に二枚のフィルターは光軸に対して垂直の配置をした場合に観察された“ゴースト”の画像である。さらにその“ゴースト”の起因はバンドパスフィルターによるものだと考えた。それを確認するため、光軸を回転軸としてバンドパスフィルターを 90° 回転した前後の画像を図3.25に示す。“ゴースト”はバンドパスフィルターの回転につれ、出る方向が変わったことがわかる。このことによって、“ゴースト”の起因はバンドパスフィルターによるものであることが確認できた。そこで、ショートパスフィルターは光軸に対して垂直の方向から 5° の角度をとれば、ショートパスフィルターとバンドパスフィルターは平行でなくなり、干渉が解消できる。そのようにして、“ゴースト”を防ぐことができた。

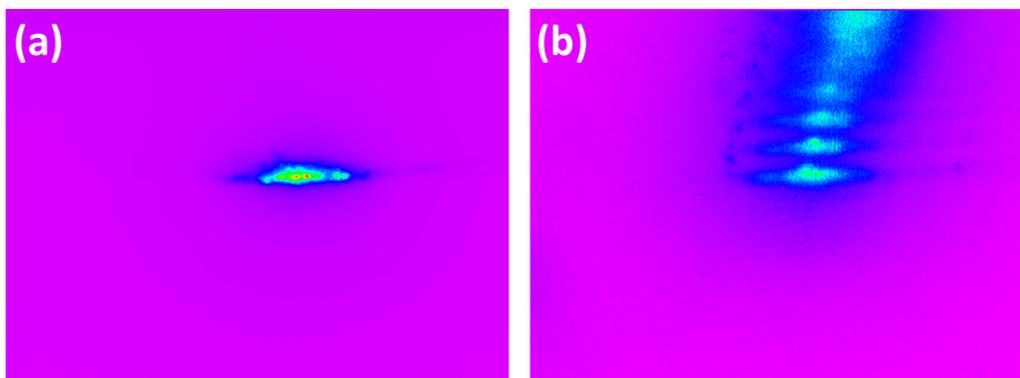


Fig. 3.24 (a) バンドパスフィルターを挿入する前の画像。(b) バンドパスフィルターを挿入した後の“ゴースト”が出た画像。

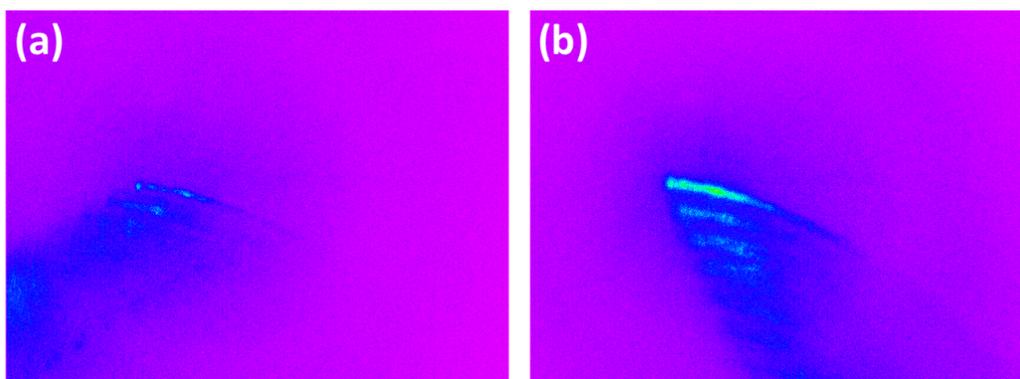


Fig. 3.25 (a) バンドパスフィルターを回転する前の画像。(b) バンドパスフィルターを光学軸を回転軸として 90° 回転した後の画像。

3.2.3 散乱法

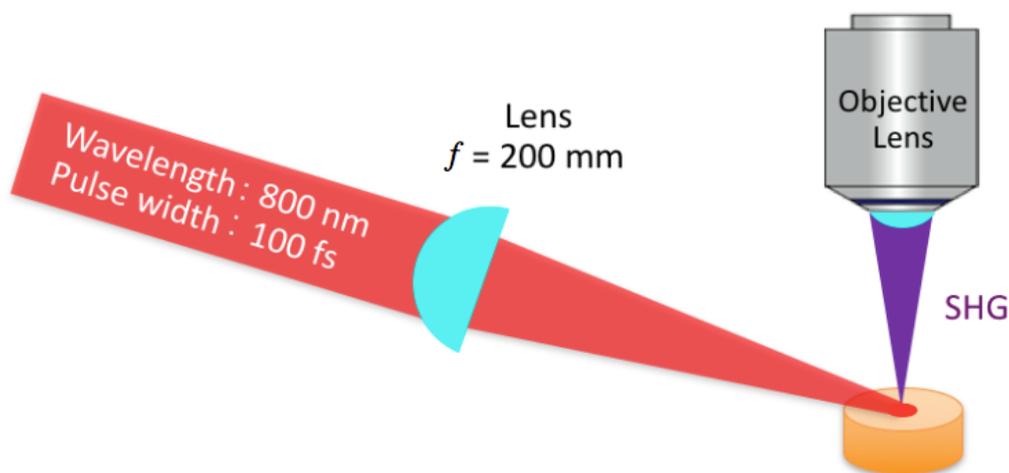


Fig. 3.26 散乱法

本研究では再生増幅器で増幅したパルスを用いている。増幅されたパルス (1 kHz) の1パルスあたりのエネルギーはシード光 (80 MHz) の80000倍になる。このパルスが対物レンズに入射すると、自己位相変調 (Self-phase Modulation) などの様々な非線形光学効果を起こして、広帯域な白色光が発生してしまう現象が起き、SHG光と区別がつかなくなる。励起光を対物レンズで集光する実験配置においては、入射光が対物レンズに入った白色光が発生し検出器に観測されてしまうので、本研究には適用しない。一方多くの他のSHG顕微鏡の例では、80000倍に増幅しないフェムト秒パルスを用いているので、上記のような問題がなく、後方散乱光や前方散乱光の実験配置が用いられている。

自己位相変調は自己アクション (Self-action) 効果の一つである。自己集束などと同じように、物質の屈折率 n と通過する光の強度 I は

$$n \propto n_0 + n_2 I \quad (3.10)$$

のような関係がある。パルス光が物質を通過する際、透過電場 E_{out} と入射電場 E_{in} は

$$E_{out} = E_{in} e^{i(\phi + \Delta\phi)} \quad (3.11)$$

のように書ける。ここで、

$$\Delta\phi(t) = \frac{2\pi\nu d}{c} n_2 I(t) \quad (3.12)$$

は屈折率が光強度の変化で生じる位相変化、 ν は周波数、 d は物質の長さである。また、光パルスの時間幅が非常に短いとき、周波数 $\nu(t) = \phi/2\pi t$ は非常に大きな値になる。よって、透過光の周波数スペクトルが非常に広がって、可視領域より広いスペクトルをもつ光になる。

入射光の中心波長は 800 nm なので、生成する SHG の波長は 400 nm となる。ここで、フェムト秒パルスを用いて SHG を観察するので、スーパーコンティニューム (Supercontinuum, SC) 光が発生した場合は、SHG と同じ波長の 400 nm の光も発生する。本当の SHG であるかどうかを判断するための二枚のバンドパスフィルターはそれぞれの通過できる波長は 400 nm[図 3.23(c)] と 438 nm[図 3.23(d)] である。SHG だけの場合は、400 nm だけ光が検出できる。一方 SC 光や蛍光が発生した場合は、波長スペクトルは非常に広いから、サンプルの同じ場所において 400 nm と 438 nm の両方から光を検出できる。

現在報告された SHG 顕微鏡の研究では、光源はほとんどモードロック Ti:Sapphire レーザー (商品名は Tsunami や Mira) が使われている [23, 39, 22, 28, 40, 9, 29, 41]。モードロック Ti:Sapphire レーザーの繰り返し周波数はほとんど 80 MHz である。SHG 顕微鏡の光源として、いくつかの問題点がある。まず、物質と相互作用するには Tsunami や Mira などのモードロック Ti:Sapphire レーザーのピークパワーではまた足りないため、SHG 信号を検出するためには長時間が必要である。次に、80 MHz という繰り返し周波数では、試料には大量の熱がたまり、試料の温度が上がりやすい。この問題を解決するため、本研究では再生増幅器を用いて、モードロック Ti:Sapphire レーザーからのフェムト秒パルスのピークパワーを 80000 倍を増幅して、SHG 顕微鏡の光源として使用した。繰り返し周波数は 1 kHz にしているので、試料には大量の熱がたまらなくなる。また、ほとんどの SHG 顕微鏡は光源を対物レンズを通して試料に照射するが、光は焦点に絞られて照射面積は極めて小さい。サンプルの全体像を検出することが難しい。本研究では、図 3.26 のように、光源を対物レンズを通さずに、斜めから試料に照射する。照射面積はレンズと試料間の距離で調整できる。この光源と照射方法に対する改良は、本研究における一つの大きな特徴である。

3.2.4 シリコン基板

シリコンはバルクの構造に反転対称性がある。そのためにバルクのシリコンからはSHGが発生しない。本実験においてはSHGが発生する試料の下にSHGを出さない基板として敷き、また、薄膜縁部を観察するため、膜を二枚のシリコンで挟んで固定した。



Fig. 3.27 シリコン基板

しかし、図3.27からわかるようにシリコン表面はミラーのように反射率が非常に高い。光が複素屈折率 $N_1 = n_1 + ik_1$ の物質から複素屈折率 $N_2 = n_2 + ik_2$ の物質に垂直入射するとき、その表面反射率 R は次式で与えられる。

$$R = \frac{|N_1 - N_2|^2}{|N_1 + N_2|^2} = \frac{(n_1 - n_2)^2 + (k_1 - k_2)^2}{(n_1 + n_2)^2 + (k_1 + k_2)^2} \quad (3.13)$$

また、入射角 θ で入射するときの反射率では、P 偏光の場合は、

$$R_P = \frac{\left| N_2^2 \cos \theta - N_1 \sqrt{N_2^2 - N_1^2 \sin^2 \theta} \right|^2}{\left| N_2^2 \cos \theta + N_1 \sqrt{N_2^2 - N_1^2 \sin^2 \theta} \right|^2} \quad (3.14)$$

S 偏光の場合は、

$$R_S = \frac{\left| N_1 \cos \theta - \sqrt{N_2^2 - N_1^2 \sin^2 \theta} \right|^2}{\left| N_1 \cos \theta + \sqrt{N_2^2 - N_1^2 \sin^2 \theta} \right|^2} \quad (3.15)$$

となる。

ここで、 N_1 は空気の屈折率として $1 + i0$ とする。シリコンは光を吸収する物質なので、複素屈折率 $N_2 = n_2 + ik_2$ の虚数部はゼロではない。入射光波長が 400 nm のときシリコンの複素屈折率は $N_2 = 5.570 + i0.387$ [42] である。入射光は S 偏光で、入射角は $\theta = 60^\circ$ で式 (3.15) に代入して計算すると、シリコン基板は 400 nm の入射光における反射率は 69.5% となっている。入射光波長が 800 nm のときシリコンの複素屈折率は $N_2 = 3.697 + i0.007$ [42] である。同様に、入射光は S 偏光で、入射角は $\theta = 60^\circ$ で式 (3.15) に代入して計算すると、シリコン基板は 800 nm の入射光における反射率は 57.1% となっている。

波長が 400 nm の SHG を観察するとき、実際の SHG 像とシリコン基板から反射してきた鏡像を区別ができなくなることが考えられる。また、ゴーストができる可能性もある。特に、サクラン薄膜の表面を観察する場合、薄膜は半透明な状態なので、シリコン基板から反射してきた光が通過できるので気をつけた。

3.2.5 光学顕微鏡の分解能

平面波が障害物（例えば、スリット）にぶつかったとき、幾何学的には到達できないスリットの背後に回り込み、平面波は球面波になって伝わっていく現象を回折という。図 3.28 に示すように、スリットからスクリーンまでの距離が十分に離れている場合の回折をフラウンホーファー回折、比較的近い場合フレネル回折という。また、近すぎる領域ではフレネルの近似も適用できず、近接領域と呼ばれる。例えば、ピンホールを中心にレーザービームを入射して、後ろ側にスクリーンをおけば、フラウンホーファー回折パターンが見える。このフラウンホーファー回折パターンはエアリーパターンであり、中心の明るい領域はエアリーディスク (Airy Disk) と呼ばれる。

平行光線（平面波）をスリットに当てると、直進する光（0 次回折光）と回折す

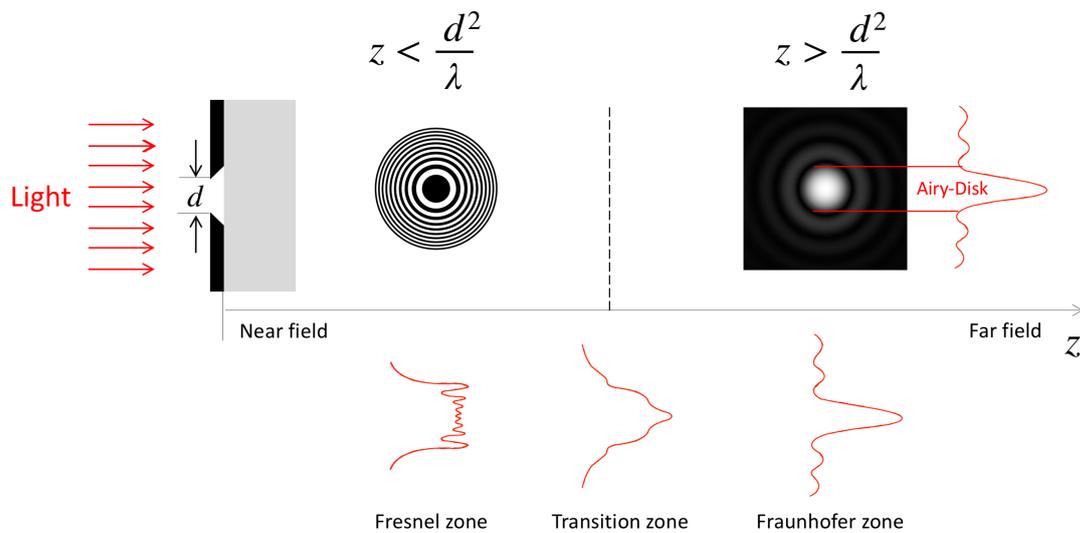


Fig. 3.28 回折

る光（± 1 次回折光）に分かれ、この 3 つの光が中間像位置で干渉して結像する。光学顕微鏡の対物レンズの場合はフラウンホーファー回折になると考える。観察対象からやってきた球面波になった光をレンズで集光させて結像される。そのとき、観察対象は複数の幅が狭いスリットから構成されると考えればよい。そのスリットの径が小さいほど、またスリットの径に対して波長が大きいほど回折角（回り込む角度）は大きくなり、レンズで捉えられなくなる。結果として細かい構造が見えなくなってしまう。逆に、平面波をレンズで集光すると、焦点の位置の光は、本当の意味での点ではなく、大きさを持っているスポットになる。このスポットの大きさは光の波長より小さくすることができない。これを、レンズの回折限界という。

図 3.29 に示すように、光が進む方向に平行な成分は 0 次回折、角度 θ （回折角）だけ振れた成分は 1 次回折である。この場合はエアリーパターンである。波長 λ の光が幅が δ のスリットにあたって発生した回折において、隣接する二つの 1 次回折光の強めあう条件は 1 波長分ずれることである。よって、

$$\delta = \frac{\lambda}{\sin \theta} \quad (3.16)$$

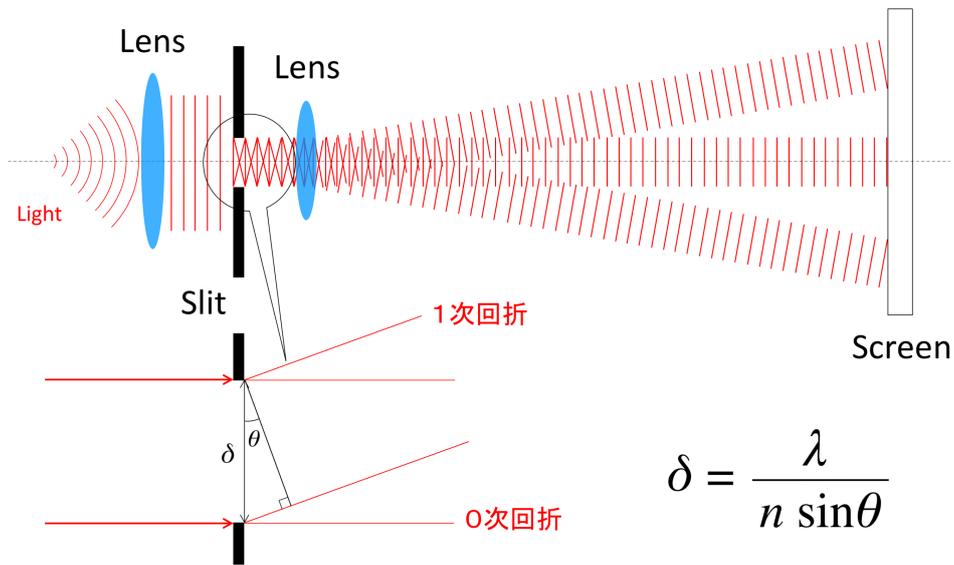


Fig. 3.29 回折限界

となる。また、スリットとレンズの間が満たされている媒質の屈折率は n であれば、波長は λ/n となる。したがって、式 (3.16) は

$$\delta = \frac{\lambda}{n \sin \theta} \quad (3.17)$$

となる。

ここで、 n は物体と対物レンズの間の媒質の屈折率、 α は図 3.30 に示すように、対物レンズの焦点から入射する光線の光軸に対する最大角度とする。このとき、対物レンズはその最大角度 α より小さな回折角をもつ回折光しか捉えられてない。

レンズの直径は D 、焦点距離が f のとき、 $D \ll f$ において

$$\sin \alpha = \sin \left(\arctan \frac{D}{2f} \right) \approx \sin \frac{D}{2f} \quad (3.18)$$

となる。

19 世紀後半に、Ernst Abbe (1840-1905) は、結像可能か否かはレンズで回折光が捉えられるかどうかで決まることから、レンズによって捉えられる最小のサイズ δ_{Abbe} として空間分解能を定義した。Abbe を記念するために、その回折限界による

空間分解能を表す式 (3.19) は、ドイツ・イエーナ大学の生理学棟の建物の前にある Ernst Abbe の記念碑に刻印されている。

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (3.19)$$

ここで、 d は結像した輝点の直径、すなわち、空間分解能である。 λ は光の波長、 n はサンプルとレンズの間に存在する物質における屈折率、 α はレンズの光軸に対して入る光線の最大角度である。

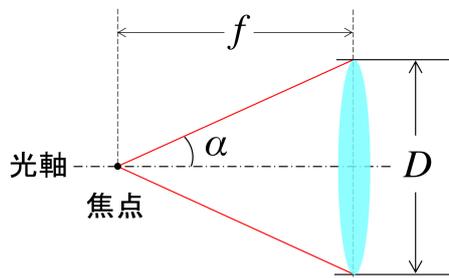


Fig. 3.30 開口数

また、レンズはどれだけ大きく回折した光を捉えることができるかを表す量は開口数 (Numerical Aperture, NA) といい、以下のように定義されている。

$$NA = n \sin \alpha \quad (3.20)$$

ここでは、レンズの収差などの影響は考慮していない。

改めて開口数を用いて Abbe が定義した空間分解能は以下のように書ける。

$$\delta_{\text{Abbe}} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (3.21)$$

前述したように、極めて小さい丸い輝点から出た光をレンズにより結像させると円形に広がった回折像となる。図 3.31 に示すように、この輝点の位置を d だけずらると、2つの輝点が2つの円形像になるように判別でき始める。この2つの円形像を判別できる最小の距離が、ちょうど2つの円形像の中心が相互のエアリーディスクの半径上にくるときと定義されている。これは、Lord Rayleigh (1842-1919) が定義

されたレンズの分解能である。同様に、レンズの収差などを無視することを前提としている。

レイリーの空間分解能は次の式で表される。

$$\delta_{\text{Rayleigh}} = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}} \quad (3.22)$$

同様に、 λ は光の波長、NA はレンズの開口数である。

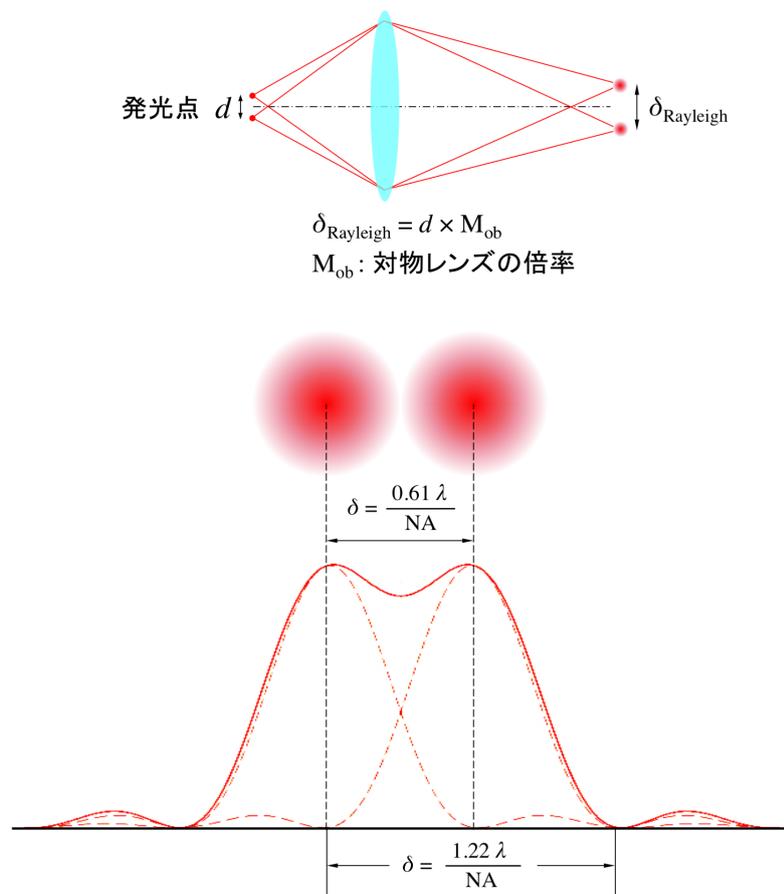


Fig. 3.31 レイリーの空間分解能

本研究で用いた対物レンズの開口数 NA は 0.15 である。空気中で測定するので、物体と対物レンズの間の媒質の屈折率 n は 1 をとる。観察する SHG 光の波長 λ は 400 nm である。式 (3.22) に代入すると分解能 δ は 1.6 μm となる。

3.2.6 CMOS イメージセンサと II-CCD イメージセンサ

CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) カメラと CCD (Charge Coupled Device) カメラの受光部はいずれもフォトダイオードである。フォトダイオードは光電効果を利用して光が電荷に変換される。発生する電荷の量は光の強度に比例する。CMOS は画素ごとに増幅器を設けて、光変換された電気信号を読み出して増幅する。しかし、微弱な光を S/N (信号雑音比) 良く計測することができない。CCD はシリコンの上に絶縁膜である二酸化ケイ素に多数の電極を配列させた電荷結合素子である。いわゆる、MOS キャパシタを並べた構造である。各電極に電圧を与えることによってポテンシャルの井戸を作り出すことができる。その電圧を制御することによって各素子の電荷が隣の素子に転送されることができる。また、II-CCD (Image Intensifier - Charge Coupled Device) はイメージインテンシファイア CCD イメージセンサである。イメージインテンシファイア (Image Intensifier) は高コントラストな映像増強管である。極めて微弱な光を検知して増幅することができる。

本研究で用いた CMOS カメラは Lumenera 社の Lu135M 型、II-CCD カメラは浜松ホトニクス社の PMA-100 である。この CCD カメラは冷却型高感度 ICCD カメラである。光電面の冷却によって暗電流ノイズの低減を行い、微弱光を S/N (信号雑音比) 良く計測できる。また、結露による曇りを防止するため、乾燥窒素を送る。II-CCD カメラ (浜松ホトニクス PMA-100) において、量子効率を図 3.32 に示す。また、図 3.33 は II ゲイン電圧とルミナンスゲインの関係を示す。

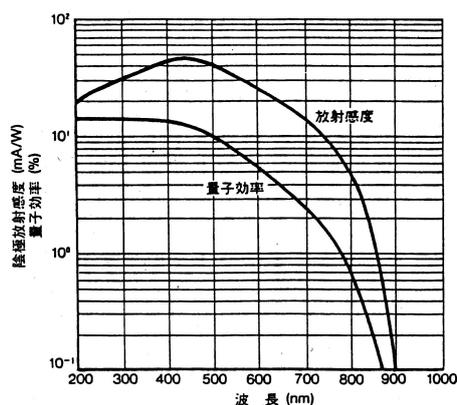


Fig. 3.32 II-CCD カメラ (浜松ホトニクス PMA-100) における量子効率

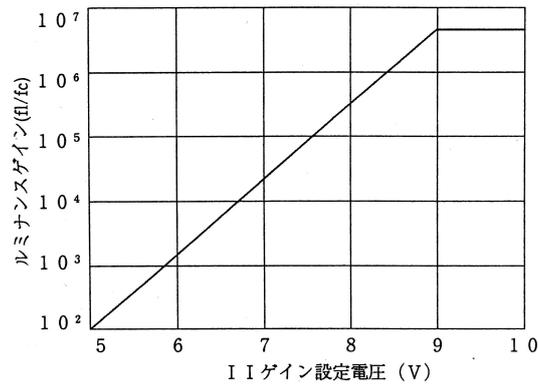


Fig. 3.33 II-CCD カメラ (浜松ホトニクス PMA-100) における II ゲイン電圧とルミナンスゲインの関係

実験では、CMOS カメラを用いてフォーカスを合わせ、II-CCD カメラで SHG を計測する。なお、SHG の計測は光子計数 (Photon Counting) で行う。

3.2.7 本研究で開発した非線形光学顕微鏡の空間分解能

本研究で開発した非線形光学顕微鏡の空間分解能は、II-CCD カメラのチップサイズ ($11 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$) によって制限されている。表 3.1 は、波長 400 nm (SHG の波長) のとき、II-CCD カメラのチップサイズによって制限される空間分解能と Rayleigh の定義による空間解像能を示している。実際に、対物レンズは $\times 5$ と $\times 20$ の場合は、空間分解能が II-CCD カメラのチップサイズで制限され、 $\times 50$ の場合は Rayleigh の分解能に制限される。

Table 3.1 Spatial Resolution

Objective Lens	II-CCD Camera	δ_{Rayleigh}
$\times 5$ (NA = 0.15)	2.6 μm	1.6 μm
$\times 20$ (NA = 0.46)	0.65 μm	0.53 μm
$\times 50$ (NA = 0.50)	0.26 μm	0.49 μm

第4章 フェムト秒パルスレーザー SHG 顕微鏡システムの性能 評価

本章および第5, 6, 7章では特別の説明がない限り、入射光パワーを P 、積算時間を t 、CCD カメラのインテンシファイアの設定メモリ値を I ($I = 0 \sim 7.0$) と使用して表す。また、特別の説明がない限り、本論文で示す顕微像の図における方向はすべて図4.1(b)で示した方向であり、サンプルにおける入射光偏光は x 軸と平行な直線偏光である。図4.2はイメージの強度を表す色スケールである。

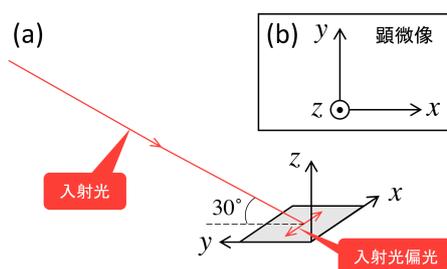


Fig. 4.1 イメージの強度を表す色スケール



Fig. 4.2 イメージの強度を表す色スケール

4.1 ZnS 多結晶ペレットのテスト観察

多結晶 ZnS (硫化亜鉛) は共有結合による化合物半導体である。閃亜鉛鉱の結晶構造は反転対称性が破れているため、バルクから非常に強い SHG が出る。ZnS 多結晶ペレットを用いて SHG 光の生成を確認し、SHG 顕微鏡の性能をテストした。短時間、低パワーで ZnS 多結晶ペレットからの SHG が観察された。

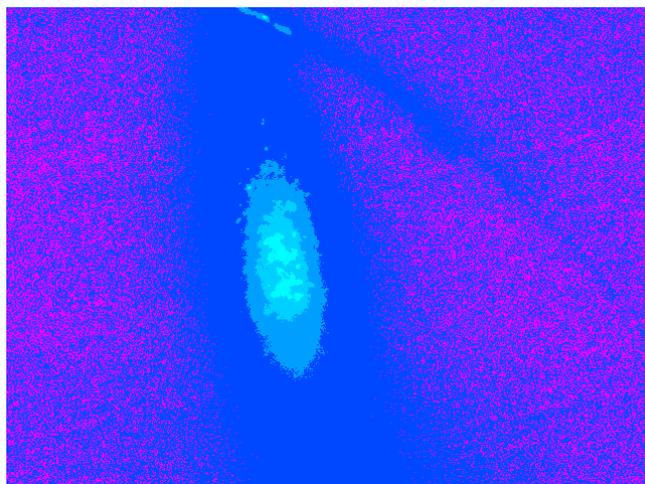


Fig. 4.3 ZnS 多結晶ペレットにあたるビームの線形顕微像 ($P = 2.98 \text{ mW}$ 、 $t = 10 \text{ s}$ 、 $I = 3.0$)

図 4.3 は、ZnS 多結晶ペレットにあたった波長 800 nm の入射光ビームの断面における強度分布である。

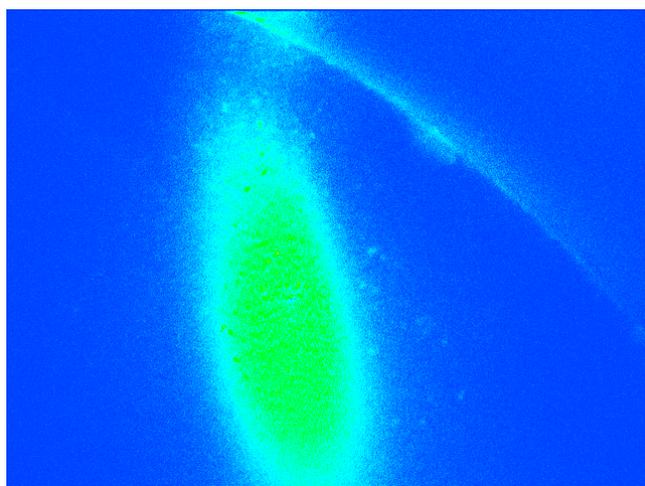


Fig. 4.4 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 2.98 \text{ mW}$ 、 $t = 60 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

図 4.4 は ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像である。さらに、積算時間を 10 s に短縮すると、SHG 像は図 4.5 のようになる。

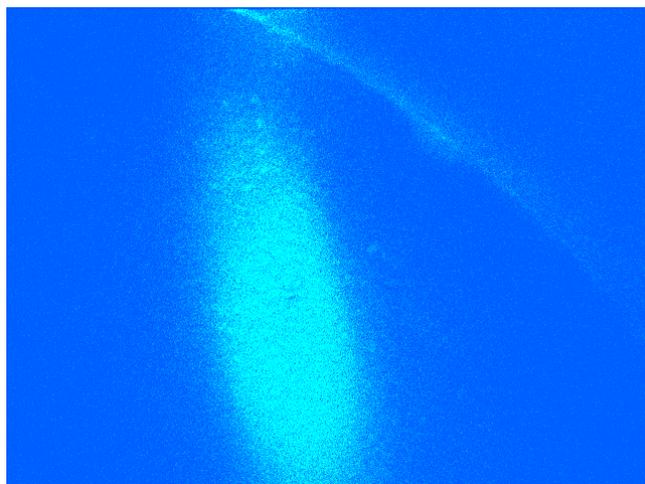


Fig. 4.5 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 2.98 \text{ mW}$ 、 $t = 10 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

ここで、400 nm のバンドパスフィルターを 436 nm のバンドパスフィルターに入れ替えた。図 4.6 は 436 nm での ZnS 多結晶ペレットの顕微像である。発光などが発生していないことがわかった。



Fig. 4.6 436 nm での ZnS 多結晶ペレットの顕微像 ($P = 2.98 \text{ mW}$ 、 $t = 120 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

4.2 フォトンカウンティングモードにおける短時間積算観察

積算時間を短縮し、図 4.7 に示すように積算時間が 1 s の SHG 顕微像である。

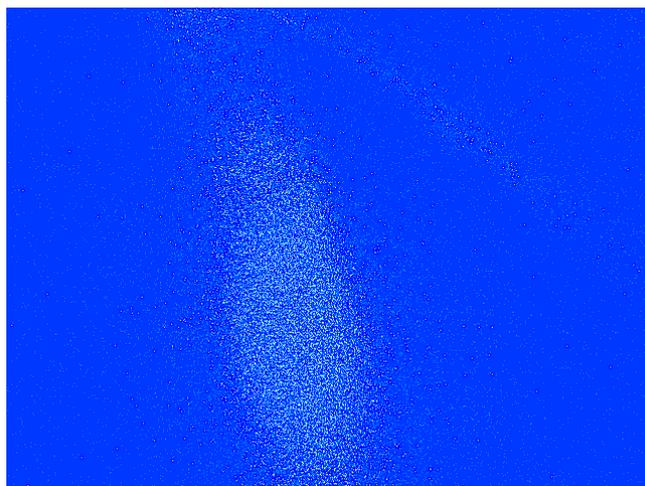


Fig. 4.7 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 2.98$ mW、 $t = 1$ s、 $I = 7.0$)

次に、積算時間を 1 s に固定して、入射光パワーを減らした。図 4.8、4.9、4.10、4.11 の入射光パワーはそれぞれ 1.80 mW、0.72 mW、0.40 mW、0.14 mW となっている。

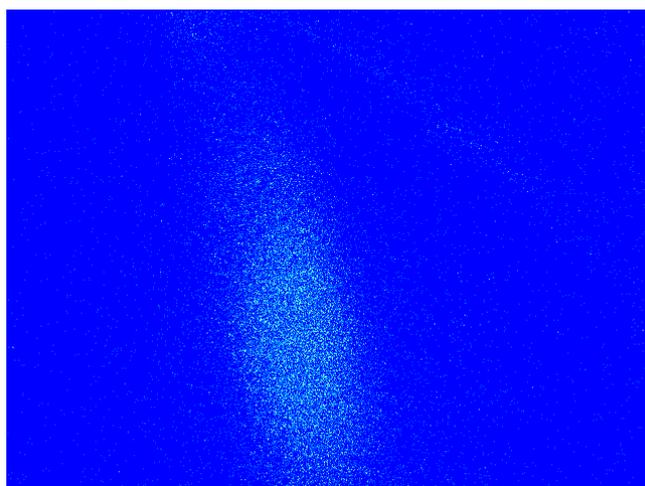


Fig. 4.8 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 1.80$ mW、 $t = 1$ s、 $I = 7.0$)

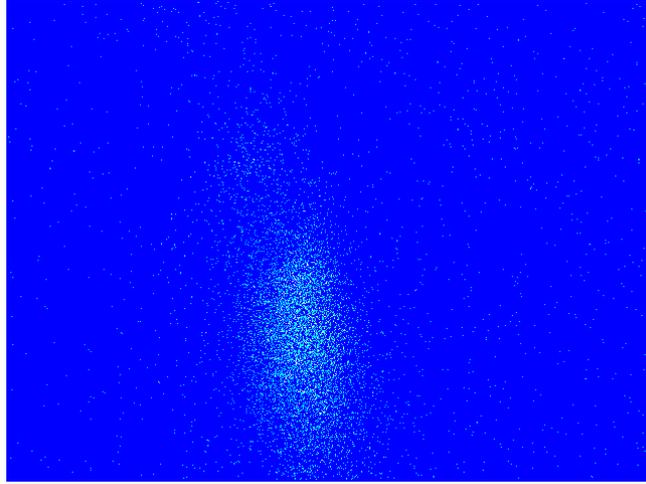


Fig. 4.9 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 0.72$ mW、 $t = 1$ s、 $I = 7.0$)

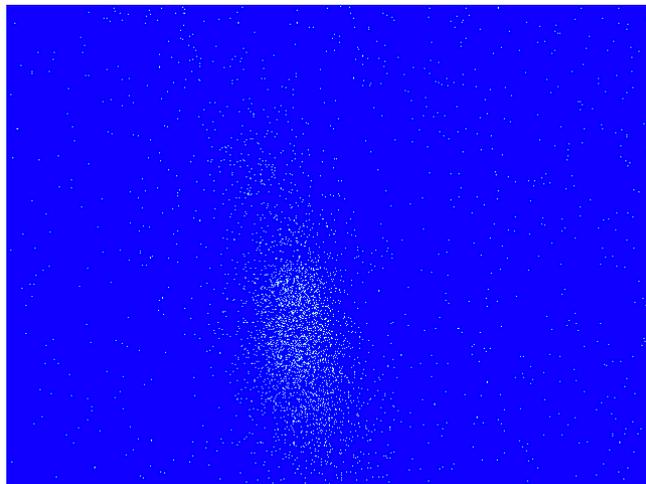


Fig. 4.10 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 0.40$ mW、 $t = 1$ s、 $I = 7.0$)

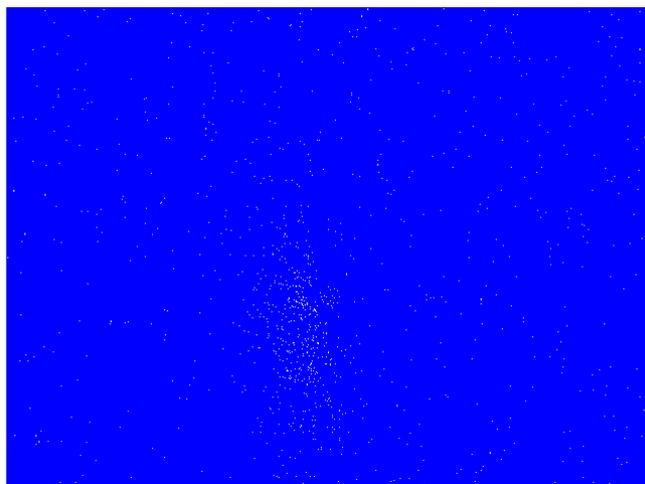


Fig. 4.11 ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像 ($P = 0.14$ mW、 $t = 1$ s、 $I = 7.0$)

入射光パワーの減少とともに、SHG 信号が弱くなることは当然であるが、このシステムを用いて、短時間、低パワーで SHG 顕微像を検出できることを検証した。

第5章 サクランのSHG顕微像観察

サ克蘭は大量の細胞外マトリックスを持つラン藻であるスイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) から抽出した新規多糖類である。サ克蘭は非常に低濃度で超高水分保持能力、ゲル化能力など、様々な学術分野や産業分野で多くの研究者が注目を集めている。しかし、サ克蘭における構造と物性はまだ十分に解明されていない。また、植物の起源とされる藍藻が作る多糖類は、一般にほとんど研究されておらず、その非対称構造に関する知見は皆無である。サ克蘭の鎖構造は異方的に配向し、SHG 光強度を増強すると予想される。SHG の非対称構造に敏感する性質を利用した光第二高調波顕微鏡 (SHG 顕微鏡) 観察により、サ克蘭における巨視的に秩序ある構造をもった部分が選択的に観察できる。本章は、非対称構造を検出することのできる SHG 顕微鏡を用いて、この超巨大分子であるサ克蘭の凝集体を観察し、その構造の理解を進めた。

5.1 サ克蘭

Red, brown, green, blue-green algae に分類されている藻類由来の多糖類は細胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) として、生命体の重要成分である。特に、硫酸化多糖類は紅藻由来のカラギーナン (carrageenan)[43, 44] に代表されるように天然に多く存在し、幹細胞における骨形成、脂肪生成および軟骨形成分化を誘導するなど重要な生命機能を果たす [45]。また、多糖類を化学的に硫酸化することで抗ウイルス性、抗がん性などの重要な生理活性を誘導できる [46, 47, 48, 49] など、硫酸化多糖類は食品、化粧品、薬学、医学などの分野で広く注目されている [50]。一方、植物の起源とされる多くの藍藻が硫酸化多糖類などの EPS を生産すると報告されたが [51]、藍藻の多くは大量養殖が難しいため、その EPS に関する材料科学的研究はほ

とんどない。一方、本研究のターゲットであるサクランは、大量養殖方法が確立された珍しい藍藻であるスイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) が効率よく生産する硫酸化天然多糖類である [52]。

2006 年、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科の金子グループは、光合成微生物スイゼンジノリの寒天質に存在する新規超巨大多糖類を発見して、「サクラン」と命名した。その絶対分子量 M_w を静的光散乱法で測定した結果 10-30 Mg/mol であった。図 5.1 に示したのは、サクランの構造式の一部である [52]。サクランはカルボキシル基、硫酸基と少量のアミノ基を持つ両性電解質であり、超巨大な多糖類であるという構造的特徴がある [53]。サクランは硫酸化率が糖残基あたり約 11% であるためサクラン分子鎖 1 本の上には、約 1 万個という過去に報告例のない数の硫酸基が存在する [52]。そのため、きわめて高い抗炎症性、抗アレルギー性が認められている [54, 55, 56]。また、サクラン自身が 1% 以下の少量のアミノ基を持つため、その濃度や周囲のイオン濃度の環境変化により溶液中で様々な自己組織化構造を形成する両荷電性硫酸化多糖類でもある（1 本分子鎖上に ca. 100 000 アニオンと 1 000 カチオン [53]）。

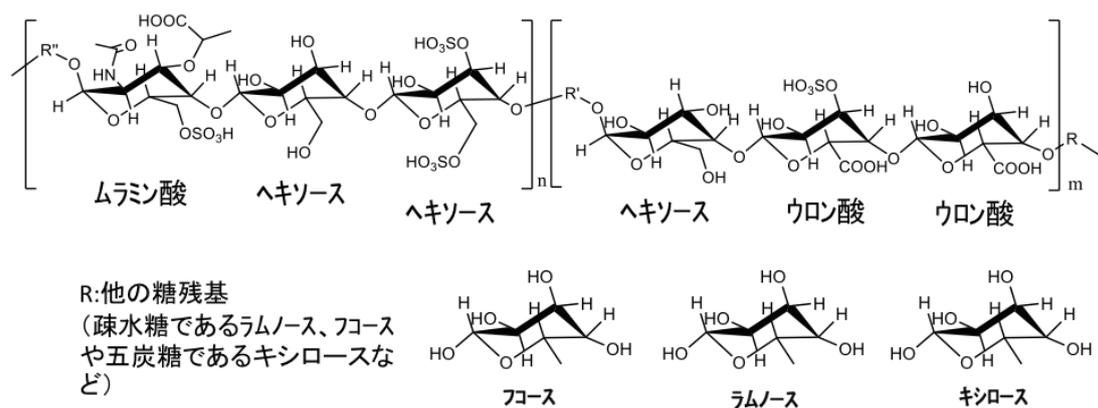


Fig. 5.1 FT-ICR-MS によって確認されたサクランの糖残基配列の一部（ウロン酸とムラミン酸を含む配列） [52]

また、一般に分子量が高い水溶性高分子の保水率は大きいとされるが、それらが生理食塩水を最大 200 倍程度しか保持できないことに対して、サクランは自重の 6100 倍もの純水を保水し、かつ生理食塩水を 2600 倍も保持できる。従来の高分子吸収体より 10 倍以上の塩水保持率も持っている。高分子は一般に塩の存在により凝

集するので、純水の場合と比較して塩水の保持率は非常に低い。一般の高分子（例えば、ヒアルロン酸）は、図 5.2 に示すように、塩存在下では、ヒアルロン酸は点のように見え、収縮している状態を示す。一方、サクランは図 5.3 に示すように、長さが 13 μm にも達する棒状組織体を形成した。このことより、サクラン水溶液の粘性および弾性率が劇的に増加した [57]。そこで、細胞は多くの水分を含んだ状態でもその形を保っていて、自身の弾性率を十分に高く維持する。この原因はアクチンタンパク質が形成する棒状組織体が「細胞骨格」として機能することである。同様に、サクランにおける高い塩水保持率は「棒状組織体に水溶液を支える骨格としての機能」があると推測できる。しかし、その棒状組織体が形成されるメカニズムと高い塩水保持率との関係は、まだ明確にされていない。

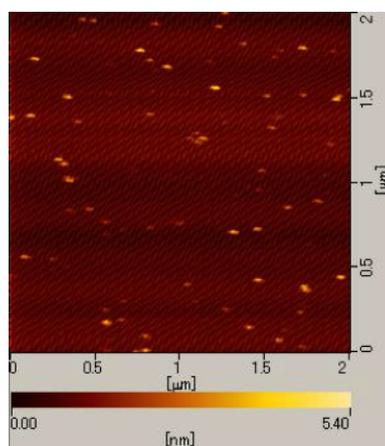


Fig. 5.2 塩存在下のヒアルロン酸（ヒアルロン酸ナトリウム）の AFM 像。ヒアルロン酸は塩添加により点のように見え、収縮していること示す。

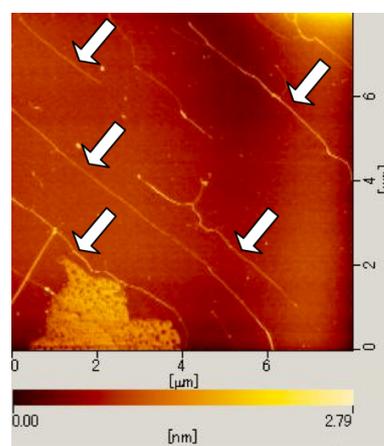


Fig. 5.3 サクラン棒状組織体の AFM 像。Reprinted with permission from ref [53]. Copyright 2008 by the American Chemical Society.

5.1.1 サクランの構造

赤外分光法 (IR) でメチン基、ヒドロキシ基、硫酸基、カルボキシ基の四つの官能基が確認された [52]。また、X 線分光法 (XPS)、元素分析や様々な定性分析を組み合わせによって、硫酸基 (10 mol% 対糖残基)、カルボキシ基 (22 mol% 対糖残基) を定量した [52]。サクランの糖残基の分析をガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS)

法およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FI-ICR-MS) 法で分析した結果は、2種のウロン酸と7種の中性糖が含まれ、さらに硫酸化ムラミン酸という新規糖も含まれることが判明した [53]。この新規糖は、一つの単糖にヒドロキシ基だけでなく、カルボキシ基、硫酸基、アミド基の合計四つの官能基をもつ非常に珍しい構造のものである。

サクランは抽出天然分子としては最も高い分子量を持つ超巨大多糖類である。通常は数千万を超える分子量を持つと想定される多糖類でも、抽出時に酸やアルカリによる分解が要因で分子が切断され、抽出時には分子量が低下する場合が多い。その結果、一般的な多糖類の分子量は数十万から数百万となる。サクランは抽出後も依然として高い分子量をもって、絶対平均分子量は 10-30 Mg/mol の大きな値となっている。また、ポリマーの場合は、共有結合で繋げて長く伸ばしていくと、分子鎖レベルでのエントロピーがどんどん下がり、高分子量になればなるほど、それだけで熱力学的に不安定になる。したがって、高分子量化するには高エネルギーが必要となる。したがって、ポリマーであればいくらかでも分子量が大きくなることはない。また、このような大きな分子の分子量を測定する方法論もほとんどなく困難を極める。多角度静的光散乱検出器でサイズ排除クロマトグラフィーの一種であるゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography, GPC) を行うことで測定できるが、分子のサイズが大きくなると溶解性や物理的ショックで分子切断が起こるため、単離・測定がほとんどできず、ほとんど限界の数値になる考えられる。サクランの場合は、極めて硬い分子鎖からなり通常のプロペラ攪拌程度では切断しないことが功を奏した。また、分解酵素も一般の環境には存在しないようで、普通の水の中で1年以上、37°Cでインキュベートしても分解しない。また、0.0001%の超希薄溶液の構造を SPring-8 (播磨科学公園都市、大型放射光施設) の放射光をさらに強めた X線を用いて調べることでほぼ一本鎖となっている。

5.1.2 サクランの溶液物性

5.4に示すように、原子間力顕微鏡と透過型電子顕微鏡で観察された結果からサクランは塩の存在下で二重螺旋を形成することが推定できた [57]。一般の分子鎖では、図 5.2 のヒアルロン酸のように塩を加えると収縮した立体構造となるので粘

性は下がるが、サクランに関しては、塩を加えることで二重螺旋形成などの会合が促進される。サクランは0.004 wt %という極めて低い重複濃度を示し、ヘリックスへの転移が0.1 wt %で観察され、0.2 wt %で弱いゲルが形成され、0.2 wt %以上において液晶ドメインが観察された [58]。また、サクランを直交偏光子を用いて観察した結果は、0.2 から 0.5 wt% にサクラン水溶液のネマチック液晶化における臨界濃度があることがわかった [57]。また、2013 年、三俣らは、サクラン水溶液における電気伝導度およびレオロジー特性の研究より、溶液の濃度および分子鎖の電荷密度で、サクランにおける溶液物性、自己組織化、ゲル化、および液晶化のメカニズムを説明した [58]。

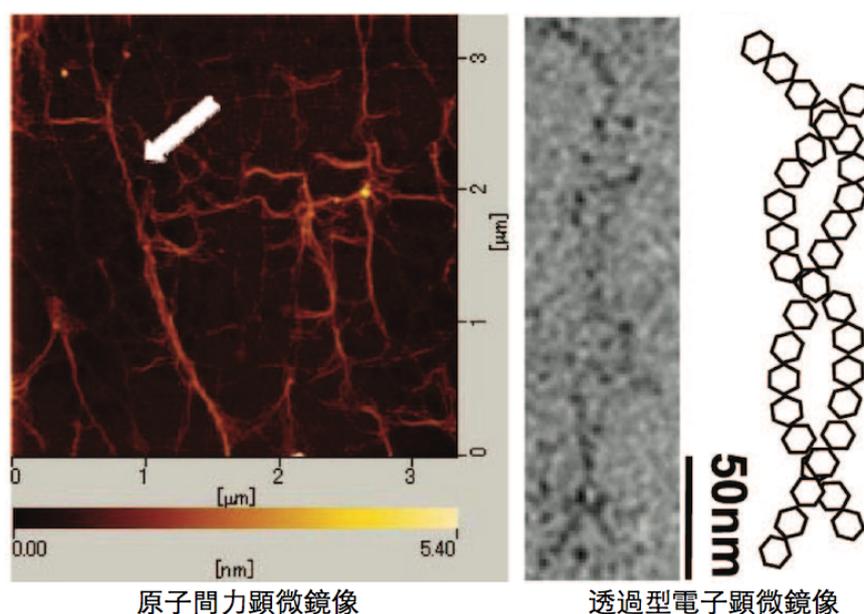


Fig. 5.4 多重螺旋を形成したサクラン分子鎖. Reprinted with permission from ref [57]. Copyright 2009 by the American Chemical Society.

5.1.3 サクランの金属吸着性

サクランにおけるウロン酸や硫酸基はアニオン性を示し、1 分子鎖には 10 万個のマイナス電荷が存在していることから、金属イオン、特に 3 価の金属イオンを効率よく吸収できる [53, 57]。濃度が 0.5 wt% のサクラン水溶液をインジウムイオンの水溶液 (0.01 M) 中に滴下すると、一瞬で液滴が固まりゲルビーズが形成された

[59]。アルギン酸水溶液をカルシウム水溶液中に滴下すると、似たようなゲルビーズ化現象が起こる。したがって、この現象は金属イオンがサクランの多糖鎖に吸着したときに生じる現象である。しかし、サクランはカルシウムイオン水溶液中ではゲルビーズは形成しなかった [59]。逆に、0.5%のアルギン酸を 10^{-3} M のインジウム水溶液中に滴下してもゲルビーズは形成しなかった [59]。

サクラン水溶液を Nd^{3+} や In^{3+} などの3価の金属イオン水溶液に滴下すると、非常に低いイオン濃度の溶液中で強固なゲルを形成した。サクランと同じアニオン性多糖類であるアルギン酸において、同じ条件でゲルの形成は見られなかった。一方、同じ条件でサクラン水溶液を Ca^{2+} や Fe(II)^{2+} などの2価の金属イオン水溶液に滴下したら、ゲルの形成は見られなかった。したがって、金属とサクランの組み合わせには相性があり、原子番号の大きな金属イオンを効率よく吸着し、特に3価の金属イオンに対し吸着特異性を有することがわかった。

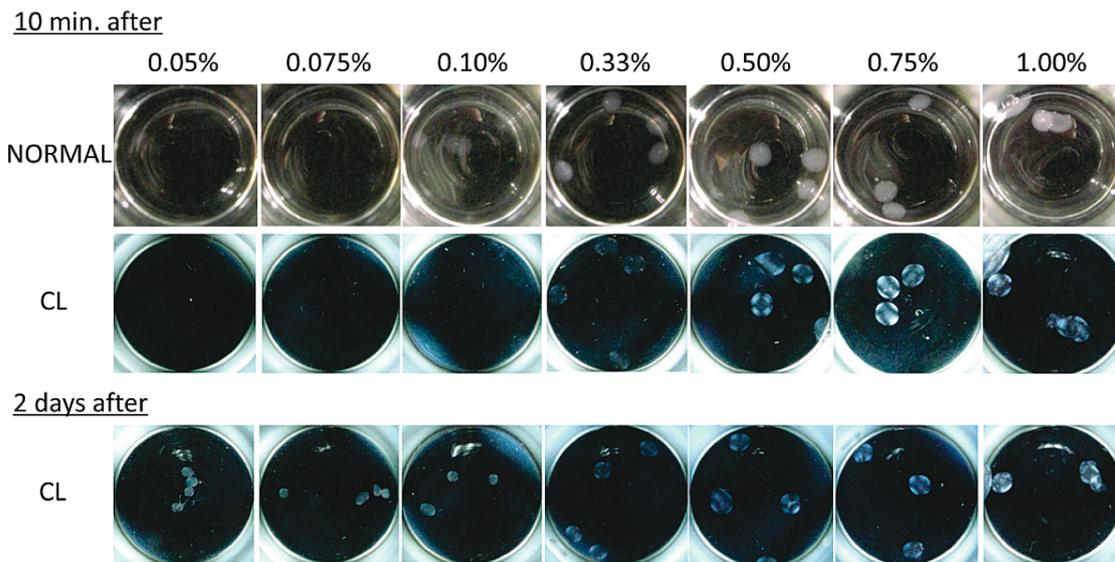


Fig. 5.5 各濃度のサクラン水溶液から得られたゲルビーズ. Reprinted with permission from ref [59]. Copyright 2009 by the American Chemical Society.

さらに、サクランの濃度とゲルビーズ形成の関係を調べるため、サクラン濃度としては0.05%、0.075%、0.10%、0.33%、0.50%、0.75%、1.00%のものを 10^{-2} M の塩化インジウム水溶液中に滴下した結果が図 5.5 である。Normal は偏光を特定しな

い可視画像であり、CLは直交ニコル（光路に偏光子を加え、偏光子を直交するように検光子を挿入し、サンプルを偏光子と検光子の間に置いて観察をすること）下における像である。0.33%以上の濃度のサクラン水溶液を滴下したときのみ瞬時にゲルビーズが形成された。0.10%以下の濃度の時には滴下後の10分後に目視としては完全に均一になったように見えたが、二日後に観察すると小さい粒が形成された。ゲル化を示すサクランの臨界濃度は0.10% - 0.33%の間にあることがわかった。これは液晶発現における臨界濃度に近い値である。図5.5の中段の濃度が0.50%、0.75%の写真における模様は、液晶による透過光の位相変化によるものである。これはゲルビーズの中でサクランが液晶状態のまま瞬時に形成し、その配向性は保たれることを示している。一方、下段の低濃度のときの不定型な沈殿の写真には、透過光の位相変化を観察されなかったので、液晶構造は一度崩壊し、その後ゆっくりと凝集し、沈殿物となって現れたものと考えられる。したがって、ゲルビーズ形成はサクラン水溶液の濃度に依存し、高い濃度においては液晶状態のまま瞬時に形成する。以上により、金属イオンの吸着におけるゲルビーズ化はサクランの液晶構造と密接に関係すると考えられる。

図5.6に示すように、サクラン液晶構造中で整列したサクラン分子鎖の隙間に金属イオンが入り込む形で、液晶の螺旋構造はポケットとなって、金属イオンを捕獲する。液滴が架橋されてゲルビーズが形成されたと考えられる [59]。

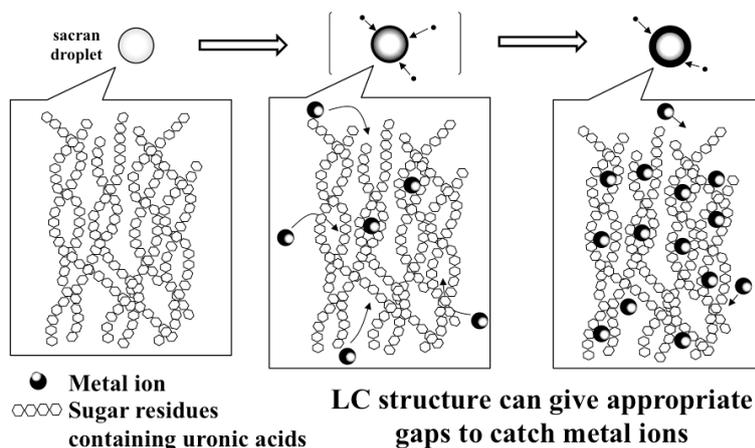


Fig. 5.6 液晶の螺旋構造よりできた金属イオンをキャッチするポケット. Reprinted with permission from ref [59]. Copyright 2009 by the American Chemical Society.

三価イオンは一価イオンよりも静電気力が高い。一方、原子番号でサイズが違うので表面電位はそれぞれ異なる。したがって、三価の中でも付着しやすいものとそうでないものがある。例えば、文献[60]では希土類の4ツ組効果を見出している。元素の種類によってサクランに吸着の効率の差が出る詳細なメカニズムはまだ分かっていないが。三価イオンは一価イオンよりも静電気力が高いことが関係すると考えられている。また、二価以上では分子鎖を架橋するので分子鎖が集まる。これによりサクランのマイナス電荷が集まることで負電荷のポテンシャルが下がり、そこに、プラスの電荷がより集まりやすくなることももう一つのメカニズムとして挙げることができる。

5.2 スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) からのサクランの抽出方法

川から採取したスイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum*) を水および有機溶媒で洗浄後、多糖類をアルカリ溶出させた後、脱水再沈殿することで繊維状物質が得られる。以下のようにスイゼンジノリからのサクランの具体的な抽出方法を述べる。

- (1) 一度凍結させた *Aphanothece sacrum* を再融解する事でフィコビリプロテインなどの水溶性物質を細胞から溶出させ、水洗により除去する。
- (2) イソプロパノールを用い脂溶性色素、クロロフィル、カロテノイド系色素などを洗浄除去する。
- (3) 洗浄した *Aphanothece sacrum* 試料を 0.1N-NaOH 水溶液で 80°C、5 時間攪拌しながら、タンパク質や DNA を分解して、サクランを溶出させる。
- (4) ガーゼ濾過で不純物を除去後、HCl 水溶液を用いおよそ pH=7-8 になるまで中和する。
- (5) イソプロパノール:水=70:30 の溶媒にサクランを含む水溶液を流し込み、攪拌することで多糖類を回収、精製する。
- (6) 回収した多糖類を再度水に溶かし、それを 100%アセトンに再度流し込み脱水、繊維化する。

5.3 観察用のサクラン

本研究では高純度サクランとサクラン薄膜を観察した。サクランを水溶液にすると粘性の高い液体となる。サクランは低濃度水溶液内では球状の立体構造となっている。一方、希薄状態からゆっくりサクラン水溶液の濃度を増加させると、自己組織化で棒状の構造に膨張し、液晶相を呈する。抽出したサクランを乾燥することで、図 5.7 の写真のようなごわごわした綿のような繊維状物質が得られる。それを観察試料の一つとして使った。

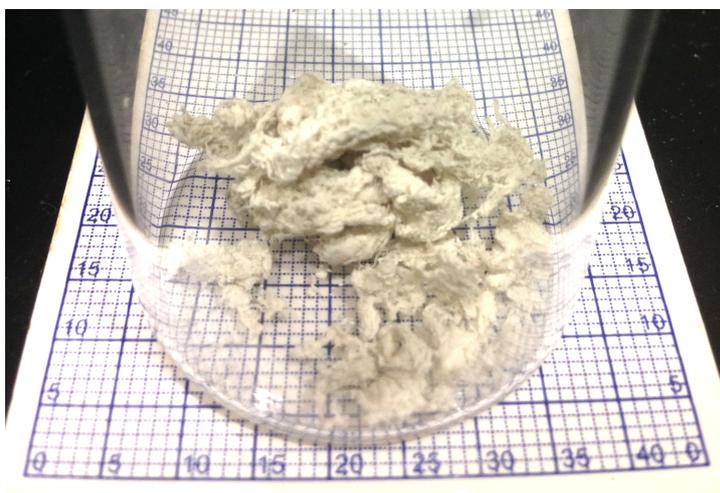


Fig. 5.7 高純度サクラン

次に、高純度サクランから薄膜を作ることができる。薄膜をつくるには、まず、乾燥サクランを 0.5 wt% の濃度で純水に溶解させる。次に、その水溶液を 60 °C で乾燥し、薄膜化する。最後に、任意の形に切り出し 120 °C で加熱処理すると、サクラン薄膜ができる。

図 5.8 に示すように、薄膜は厚み方向に層構造となっている。さらに、サクラン分子の伸び切り長は 50 μm であり、直棒として振る舞うので、薄膜の厚さは 50 μm 以下であれば、サクランの直棒は面内方向に面と平行して配向する。実際にできた薄膜を光学顕微鏡で観察した結果、は厚さは 30 μm となっている。このサクランのフィルムは水を吸収すると、厚み方向の一方向に膨潤する。厚み方向の線形膨潤率は、幅方向の線形膨潤率よりも 10000~40000 倍高かった [61]。

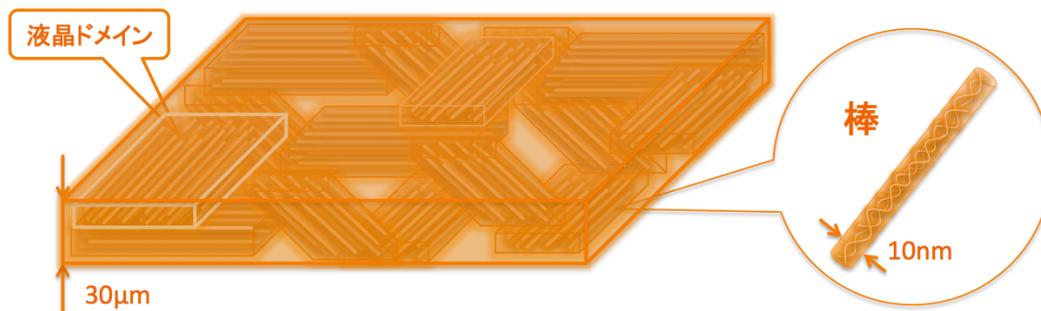


Fig. 5.8 サクランフィルム構造のイメージ

図 5.9 に示したのは、サクラン薄膜を LED 照明で照らしてとった写真である。

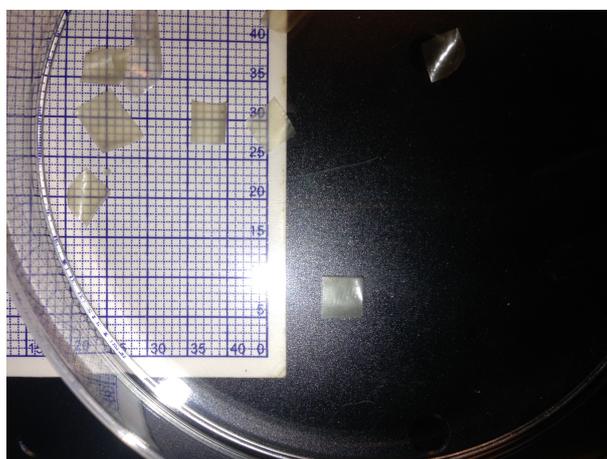


Fig. 5.9 サクランフィルム

次に、精製した高純度サクランを水で溶解して、その水溶液をそのままシリコン基板上に落とすと、室温で乾かしてキャスト膜ができる。

5.4 高純度サクランの観察

5.4.1 高純度サクランの固定観察

高純度サクランを観察した結果について述べる。図 5.10 の黄色線で囲むエリアはビームがあたる部分であり、ビームがあたる部分の面積は約 1.5 mm^2 となっている。

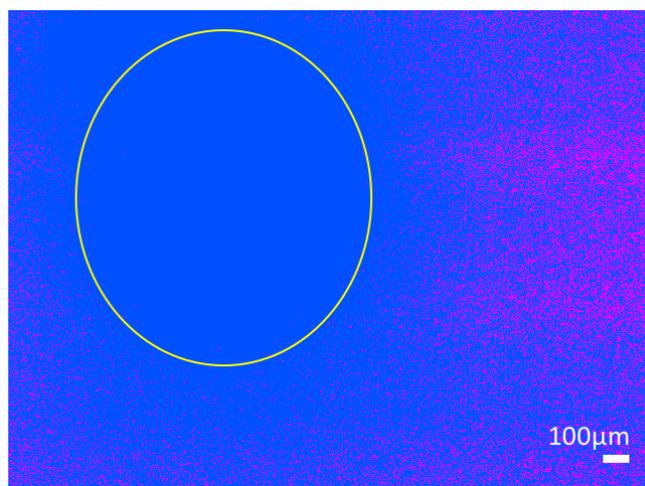


Fig. 5.10 高純度サ克蘭にあたるビームの線形顕微像

図 5.11 に示したのは高純度サ克蘭から発生した SHG である。数十 μm の粒子状の SHG 像が観察された。

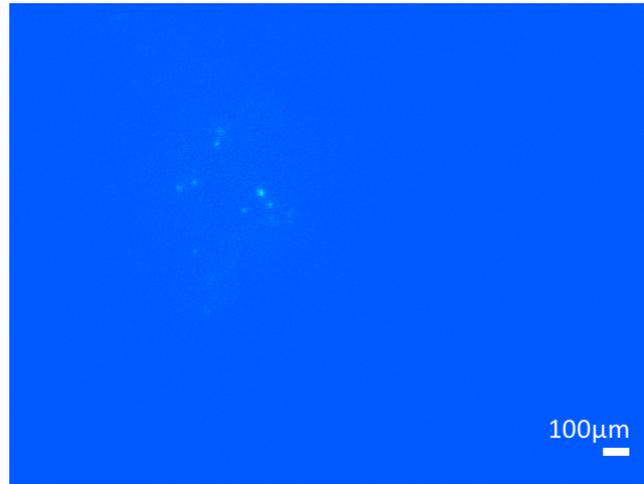


Fig. 5.11 高純度サクランの SHG 顕微像 ($P = 8.0$ mW、 $t = 300$ s、 $I = 5.0$)

次に、積算時間を長くすると、図 5.12 に示すように、クリアな SHG 顕微像が観察された。

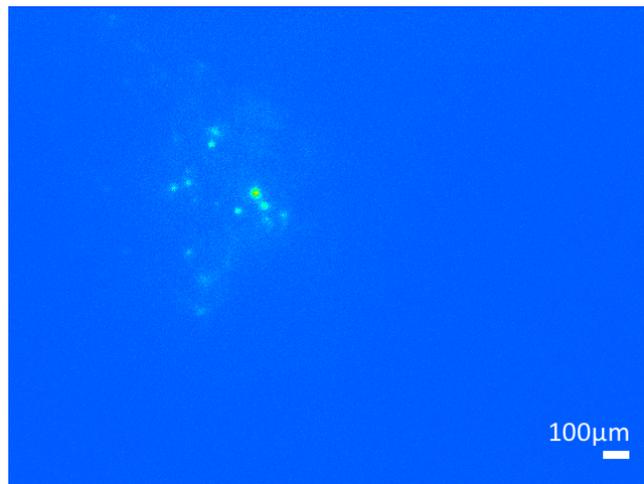


Fig. 5.12 高純度サクランの SHG 顕微像 ($P = 8.0$ mW、 $t = 1800$ s、 $I = 5.0$)

ここで、400 nm のバンドパスフィルターを 436 nm のバンドパスフィルターに入れ替えた。図 5.13 は 436 nm での顕微像である。バンドパスフィルターが 400 nm の時に観察される強度信号には 2 つの可能性がある。すなわち、1 つには SHG の可能性、もう 1 つは、試料が多光子で励起されてその多光子エネルギーより低い光

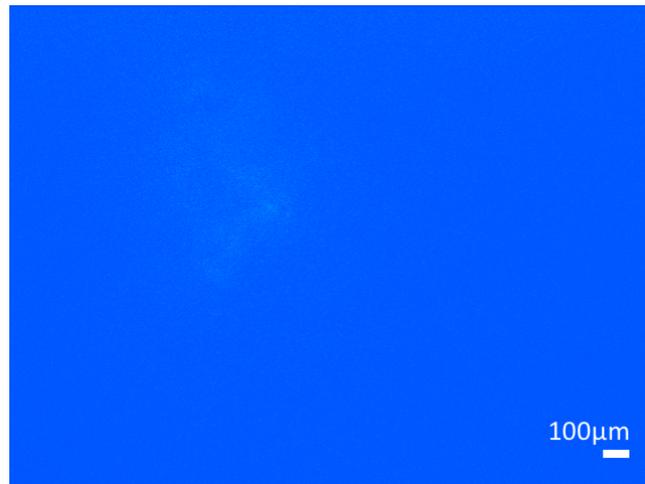


Fig. 5.13 436 nm での高純度サクランの顕微像 ($P = 8.0$ mW、 $t = 1800$ s、 $I = 5.0$)

子エネルギーのところに発生する発光の可能性はある。もし、図 5.12 における信号が後者によるものであれば、図 5.12 と図 5.13 の波長の違いは現象の発生に大きな影響を与えず、像の形は同じものとなるはずである。ところが、図 5.12 と図 5.13 では明らかに信号の空間分布が異なる。したがって、図 5.12 の信号は多光子励起発光のものではない。したがって図 5.12 は SHG が主であり、一方図 5.13 の信号は二光子励起発光と判断される。

ここで、高純度のサ克蘭における数十 μm 大きさの粒子状 SHG スポットの起源として以下の三つの候補が挙げる。候補 (1)、位相整合条件によるもの；候補 (2)、鎖の末端が見えている；候補 (3)、セルロースのように液晶ドメインがあるかと推測されている。サンプルとして使用した高純度のサ克蘭は液晶状態から乾燥してできたものなので、サ克蘭の水溶液の濃度の増加によって、サ克蘭は棒状組織体から「骨格」を形成すると推測され、乾燥しているサ克蘭も「骨格」の構造が残っていると予想している。試料に対する観察角度を変えたら、発生する SHG の強度も変化すると予想した。それを検証するため、次に高純度サ克蘭の多角度観察を行った。

5.4.2 高純度サクランの多角度観察

図 5.14 は高純度サクランを多角度から観察する方法である。試料の対物レンズに対する観察角度を変える。

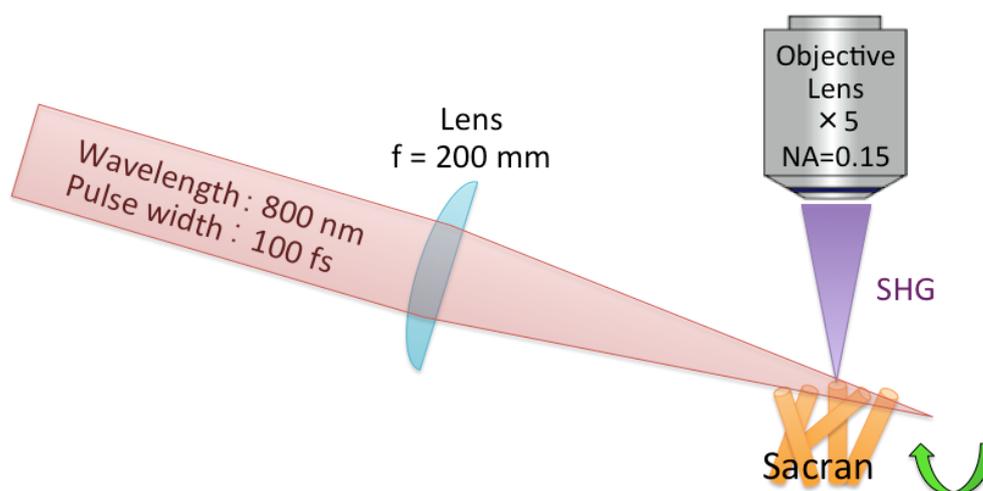


Fig. 5.14 高純度サクランの多角度観察

入射光パワー、観察位置、積算時間、インテンシファイアのすべての条件は同一にして、対物レンズに対する観察角度をそれぞれ -15° 、 0° 、 $+15^\circ$ に変化させた。

図 5.15 の上段はそれぞれの角度における高純度サクラン線形像、下段は SHG 像である。場所により強弱の角度依存性が違う。数十 μm の大きさの粒子状の SHG 像が観察された。同じ位置であっても SHG 光の強度が変化したことがわかった。

次に、400 nm のバンドパスフィルターを 436 nm のバンドパスフィルターに入れ替えた。図 5.16 は観察波長 436 nm での顕微像である。多少に信号を検出したが、400 nm の SHG 光と明らかに異なり、カットされなかった入射光や迷光と考えられる。すなわち、図 5.15 の粒子状のイメージは SHG 応答である。400 nm のバンドパスフィルターで観察されたのは確かに SHG であることがわかった。

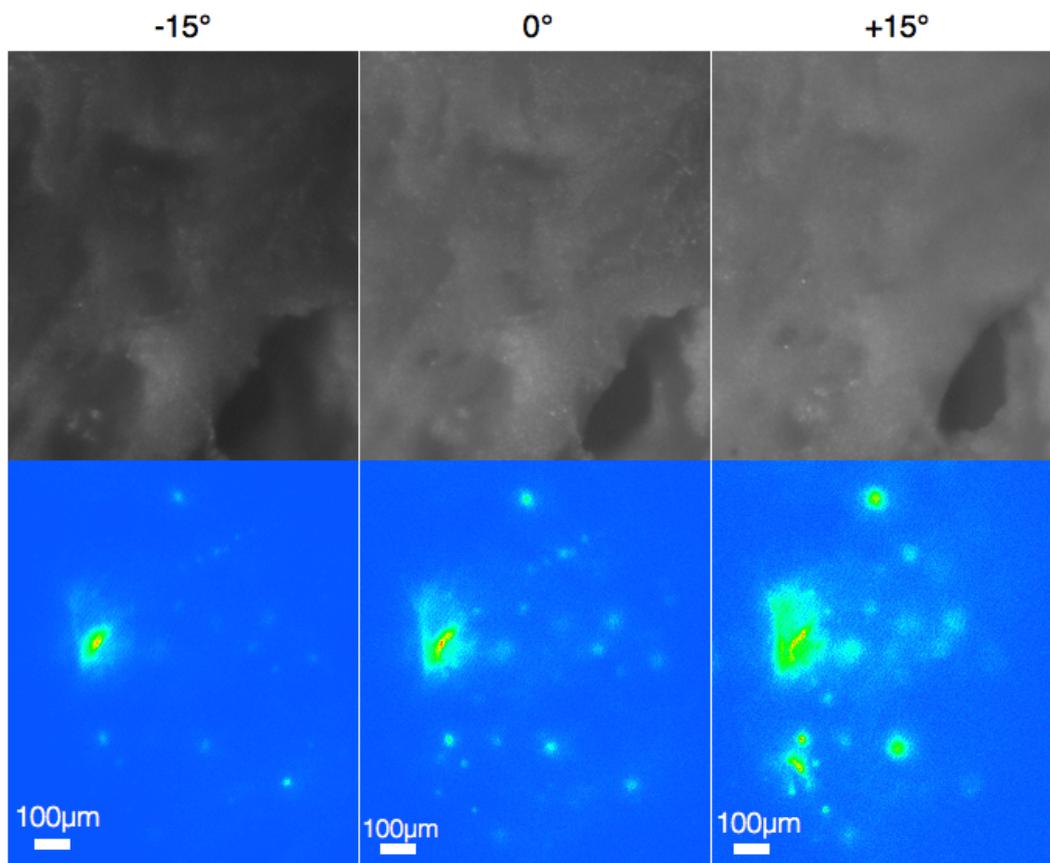


Fig. 5.15 各角度の高純度サクランの線形像と SHG 像 ($P = 8.6 \text{ mW}$, $t = 1800 \text{ s}$, $I = 7.0$)

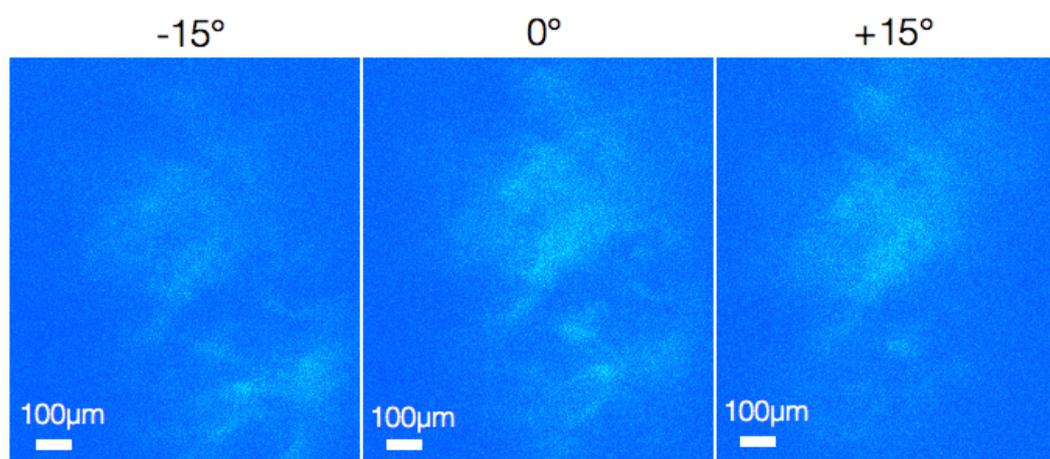


Fig. 5.16 436 nm での各角度の高純度サクランの顕微像 ($P = 8.6 \text{ mW}$, $t = 1800 \text{ s}$, $I = 7.0$)

5.5 サクラン薄膜の観察

ここで、5.3節で述べた一方向に膨潤性をもつサクラン薄膜を観察した。そのサクラン薄膜を光学顕微鏡で測定した結果、薄膜の厚さは $30\mu\text{m}$ である。サクラン分子の伸び切り長は $50\mu\text{m}$ の直棒として振る舞うので、サクランの直棒は面内方向に面と平行して配向している。その薄膜表面と薄膜縁部に対して、それぞれSHG顕微像で観察した。

5.5.1 サクラン薄膜表面の観察

サクラン薄膜表面を観察した結果について述べる。高純度サクランの観察方法と同じように、図 5.17 II-CCD カメラの感度を下げて観察した波長 800 nm の入射光の照射範囲である。

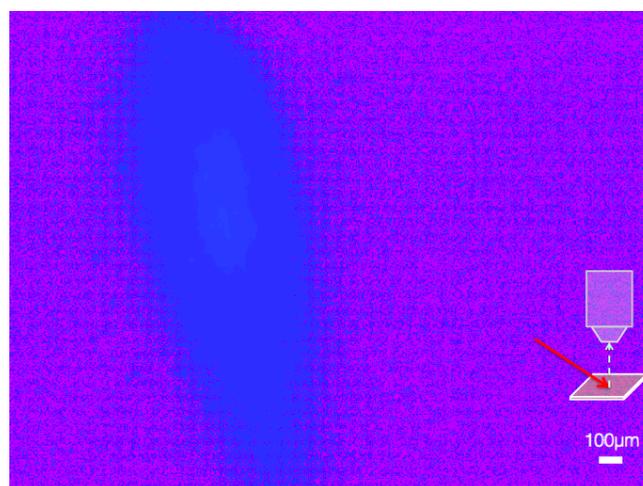


Fig. 5.17 サクラン薄膜表面にあたるビームの線形顕微像

図 5.18 に示したのはサクラン薄膜表面から発生したSHGである。高純度サクランのSHG顕微像と同じように数十 μm の粒子状のSHG像が観察された。

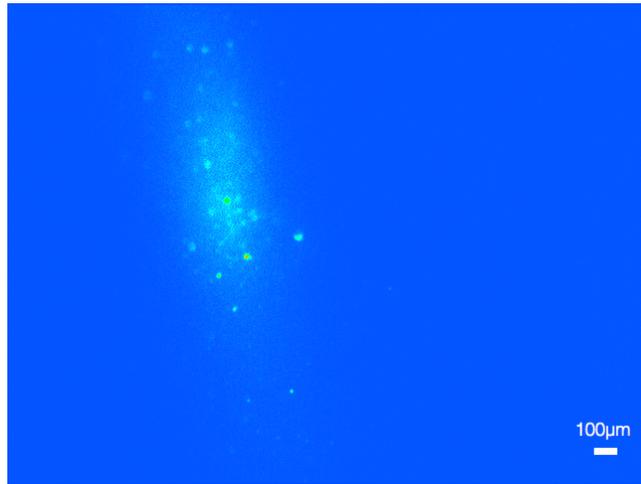


Fig. 5.18 サクラン薄膜表面の SHG 顕微像 ($P = 8.7 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

ここで、400 nm のバンドパスフィルターを 436 nm のバンドパスフィルターに入れ替えた。図 5.19 は 436 nm での顕微像である。検出された信号は発光である可能性が高いが、図 5.18 のサクラン薄膜表面の SHG 顕微像と比べて、粒子状の像がないことがわかった。粒子状の像は確かに SHG であることがいえる。

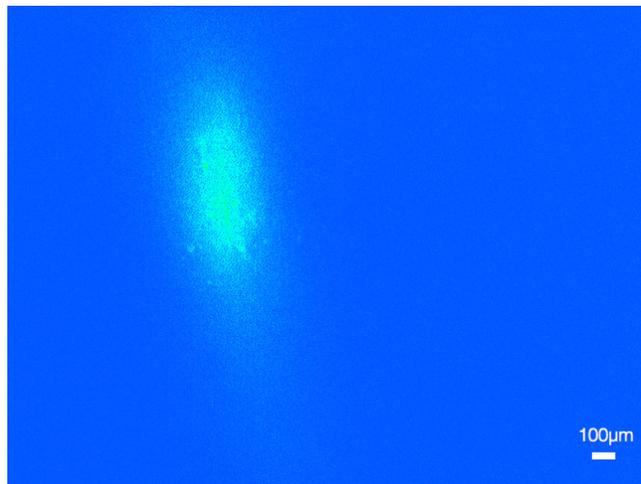


Fig. 5.19 436 nm でのサクラン薄膜表面の顕微像 ($P = 8.7 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

5.5.2 サクラン薄膜表面の多角度観察

入射光パワー、観察位置、積算時間、インテンシファイアのすべての条件を同一にして、対物レンズに対する観察角度をそれぞれ -15° 、 0° 、 $+15^\circ$ に変えて、サクラン薄膜表面を観察した。

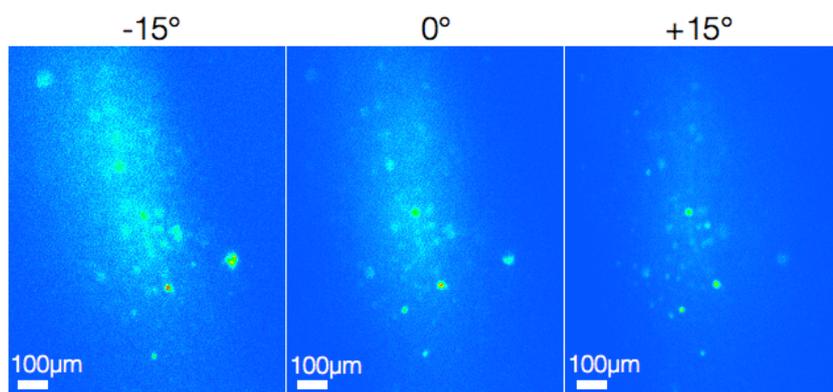


Fig. 5.20 各角度におけるサクラン薄膜表面の SHG 顕微像 ($P = 8.7 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

図 5.20 はそれぞれの角度におけるサクラン薄膜表面の SHG 顕微像である。高純度サクランの観察結果と同じように、数十 μm の大きさの粒子状の SHG 像が観察された。場所により強弱の角度依存性が異なり、同じ位置であっても SHG 光の強度が変化したことがわかった。次に、 400 nm のバンドパスフィルターを 436 nm のバンドパスフィルターに入れ替えた。図 5.21 は 436 nm での顕微像である。

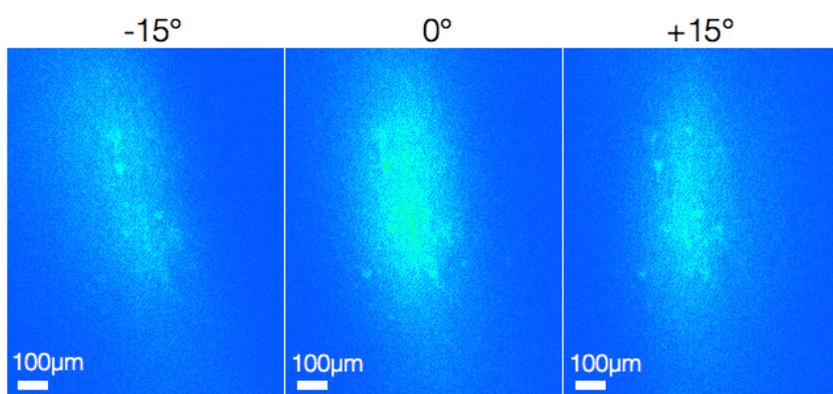


Fig. 5.21 436 nm での各角度のサクラン薄膜表面の顕微像 ($P = 8.7 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

5.5.3 サクラン薄膜縁部の観察

サクラン薄膜縁部を観察した結果について述べる。図 5.8 に示すように、サクラン分子の伸び切り長は $50\mu\text{m}$ の直棒として振る舞うので、サクランの直棒は面内方向に面と平行して配向している。したがって、薄膜縁部には直棒の端となっている。この描像を確かめるために、一枚の四角形サクラン薄膜の三つの辺 (1),(2),(3) をそれぞれ観察した。図 5.22 はサクラン薄膜のエッジにあたるビームの線形顕微像である。

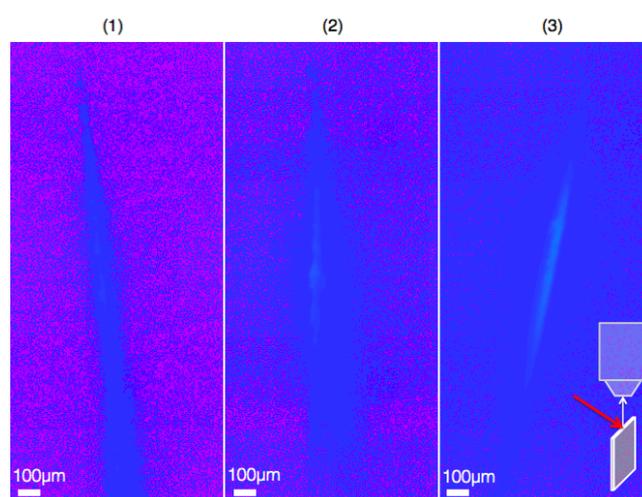


Fig. 5.22 サクラン薄膜エッジにあたるビームの線形顕微像

図 5.23 に示したのは 400 nm での顕微像である。図 5.24 は 436 nm での顕微像である。白線で挟んだ部分はエッジであるが、図 5.23 と図 5.24 の波長の違いは現象の発生に大きな影響を与えず、像の形は同じものとなっている。したがって、図 5.23 の信号は SHG であることが判断できず、多光子励起発光である可能性が高い。

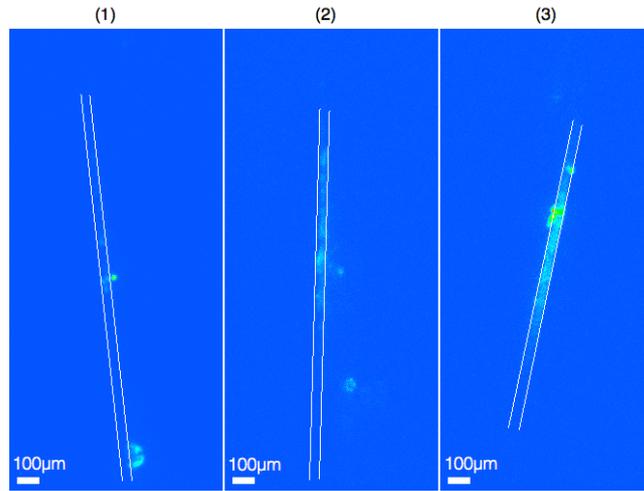


Fig. 5.23 400 nm でのサクラン薄膜エッジの顕微像 ($P = 4.1 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

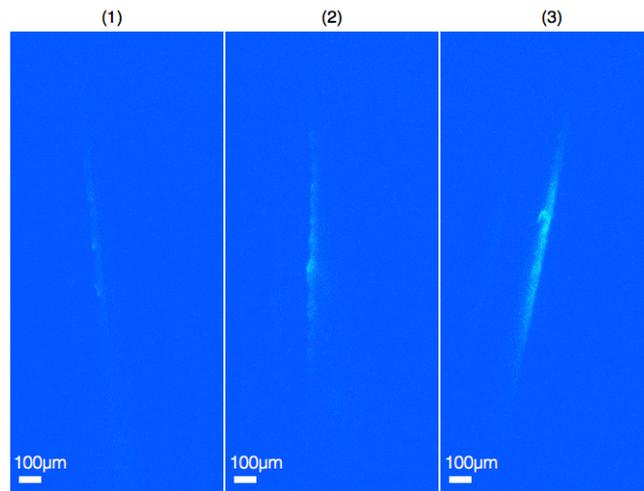


Fig. 5.24 436 nm でのサクラン薄膜エッジの顕微像 ($P = 4.1 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

5.5.4 サクラン薄膜縁部の多角度観察

入射光パワー、観察位置、積算時間、インテンシファイアのすべての条件が一致して、対物レンズに対する観察角度をそれぞれ -15° 、 0° 、 $+15^\circ$ に変えて、サクラン薄膜のエッジを観察した。図 5.25 はそれぞれの角度におけるサクラン薄膜のエッジにあたるビームの線形顕微像である。

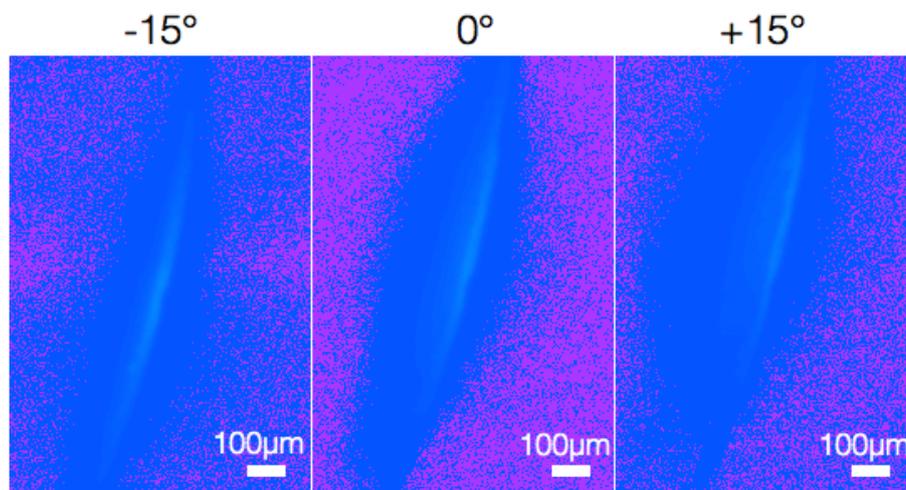


Fig. 5.25 各角度におけるサクラン薄膜エッジにあたるビームの線形顕微像

図 5.26 はそれぞれの角度におけるサクラン薄膜のエッジの 400 nm での顕微像である。いずれの角度でも SHG を検出されていない。白線で挟まった部分はエッジであるから、粒子状の SHG 信号はほとんどエッジ以外の場所（表面）から出たものである。

図 5.27 は 436 nm での顕微像である。検出された信号は発光である可能性が高い。図 5.26 と図 5.27 を比較すれば、SHG は検出されていないことがわかった。

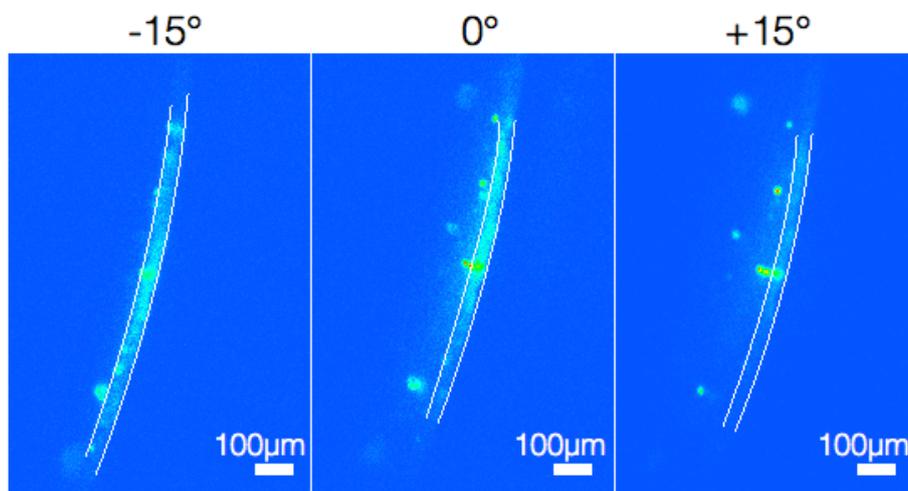


Fig. 5.26 400 nm での各角度のサクラン薄膜エッジの顕微像 ($P = 4.1 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

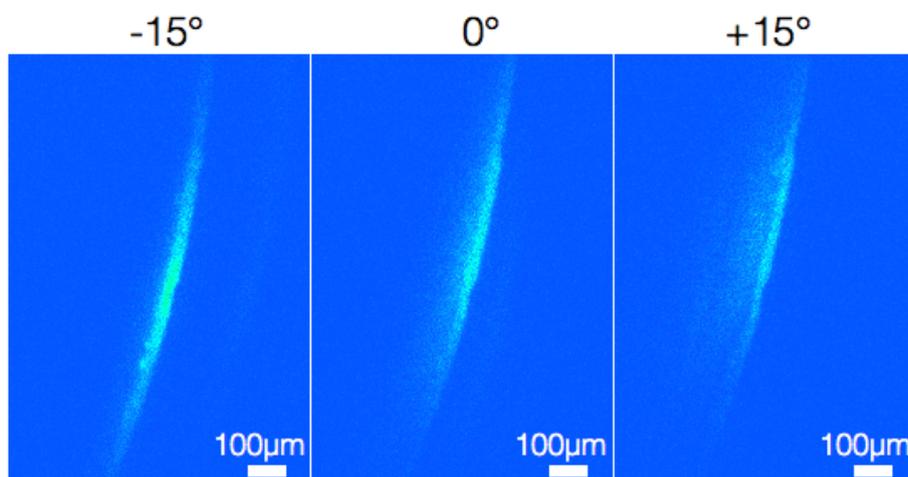


Fig. 5.27 436 nm での各角度のサクラン薄膜エッジの顕微像 ($P = 4.1 \text{ mW}$ 、 $t = 300 \text{ s}$ 、 $I = 7.0$)

5.6 サクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察

5.6.1 高純度サクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察

図 5.28(a) はスイゼンジノリから抽出し繊維化した綿状の高純度サクランである。図 5.28(b) は白色光で照明した綿状の高純度サクランの塊の光学顕微像、図 5.28(c) は、波長 400 nm のバンドパスフィルターを II-CCD の前に挿入して観察した像であり、図 5.28(d) は、バンドパスフィルターを波長 438 nm のものに替えて観察した強度像である。図 5.28(c) の SHG 像の SHG 光強度はスポット状に分布していることがわかる。SHG 像中の各点の大きさは数 10 μm 程度であった。

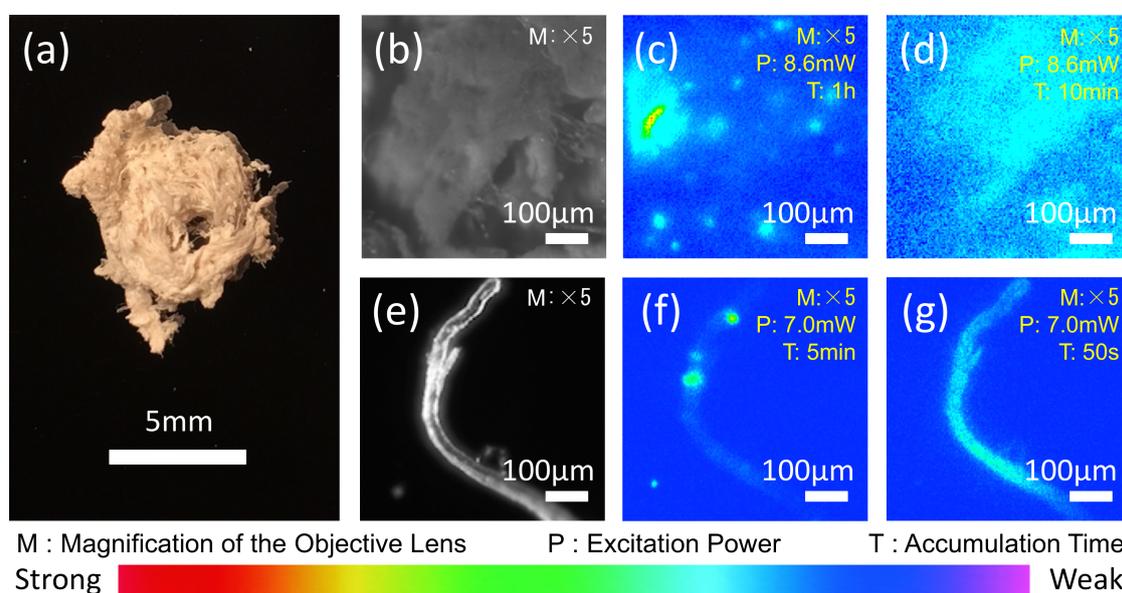


Fig. 5.28 (a) スイゼンジノリから抽出し繊維化した綿状の高純度サクランの写真。(b) 白色光で照明し、CMOS カメラ (Manufacturer: Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した綿状の高純度サクランの塊の顕微像。(c) 波長 400 nm のバンドパスフィルターを用いて観察した試料の SHG 像、および (d) 波長 438 nm のバンドパスフィルターを用いて観察した二光子発光像。(e) 白色光で照明し、CMOS カメラ (Manufacturer: Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した繊維状の高純度サクランの顕微像。(f) 波長 400 nm のバンドパスフィルターを用いて観察した試料の SHG 像、および (g) 波長 438 nm のバンドパスフィルターを用いて観察した二光子発光像。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

図 5.28(c) のスポット状の SHG の起源を考えるために、綿状の高純度サクランから繊維状のものを抜き取り、観察したのが図 5.28(e-g) である。図 5.28(f) をみる

と、図 5.28(c) と同様に数 10 μm 程度の大きさの粒子状の SHG 像が見られる。高純度のサクランは液晶状態から乾燥してできたものなので、サクランの水溶液の濃度の増加によって、サクランは棒状組織体から凝集体を形成すると推測されている [57]。SHG の発生は、液晶などのような、永久双極子をもつ分子が配向したところからよく発生する [19, 20] ので、図 5.28(f) の SHG もサクランの凝集体のミクロな構造に起因すると考えている。

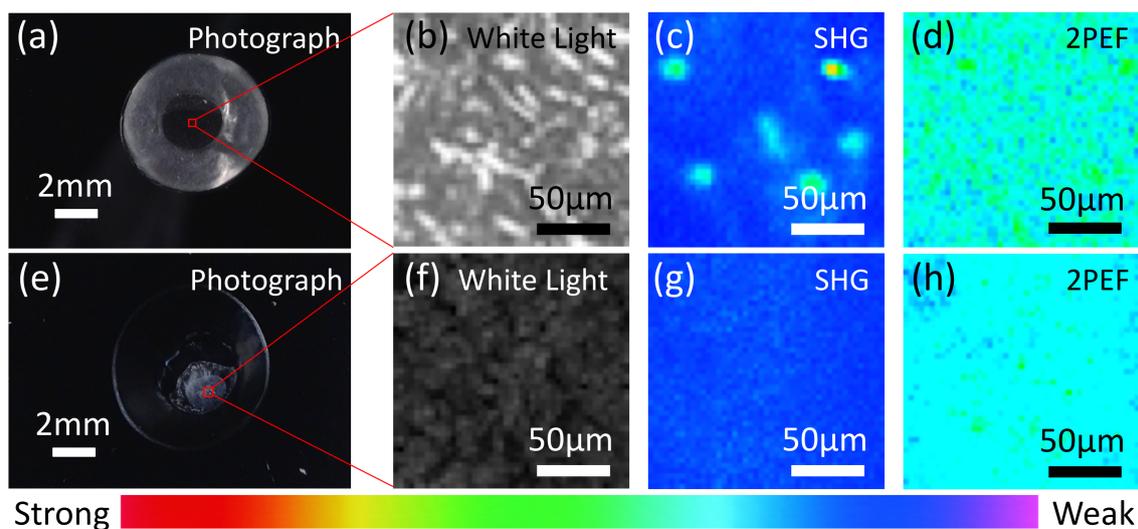


Fig. 5.29 濃度 0.5% のサクラン水溶液で作った二種類のキャスト膜 (膜厚およそ $5 \mu\text{m}$) の像。(a) 高純度サクランの水溶液をそのままシリコン基板上に落として乾かした膜の写真像。(b) 白色光で照明し、CMOS カメラ (Manufacturer : Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した顕微像。(c),(d) それぞれ (a) の膜の SHG 顕微像と二光子励起発光像。(e) サクラン水溶液を $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過した後でシリコン基板上に垂らして乾かした膜の写真像。(f) 白色光で照明し、CMOS カメラ (Manufacturer : Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した顕微像。(g),(h) それぞれ (e) の膜の SHG 顕微像と二光子励起発光像。(c),(d),(g),(h) において、入射光波長は 800 nm 、励起強度は 6.6 mW 。(b),(e) の積算時間は 5 min 、(c),(f) は 50 s である。対物レンズの倍率: $\times 5$ ($\text{NA} = 0.15$)。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

スポット状の SHG の起源をさらに考えるために、メンブレンフィルターでろ過した前後のサクラン水溶液で作った二種類のキャスト膜 (膜厚およそ $5 \mu\text{m}$) を観察した。この濾過によって、SHG スポットの原因と考えられるスイゼンジノリの細胞壁などの不純物や大きめのサクラン分子などを取り除くことができると考えた。高純度サクランの水溶液をそのままシリコン基板上に落として乾かした膜の SHG 像 (図 5.29(c)) においては高純度サクランの塊および繊維と同じようなスポット状に SHG が強い箇所が観察された。一方、メンブレンフィルター (穴径 $0.45 \mu\text{m}$) で

ろ過したあとのサクラン水溶液を滴下してできたキャスト膜には粒子状の SHG スポットは現れなかった (図 5.29(g))。

5.6.2 高純度サクランにおける SHG スポットの入射光偏光依存性

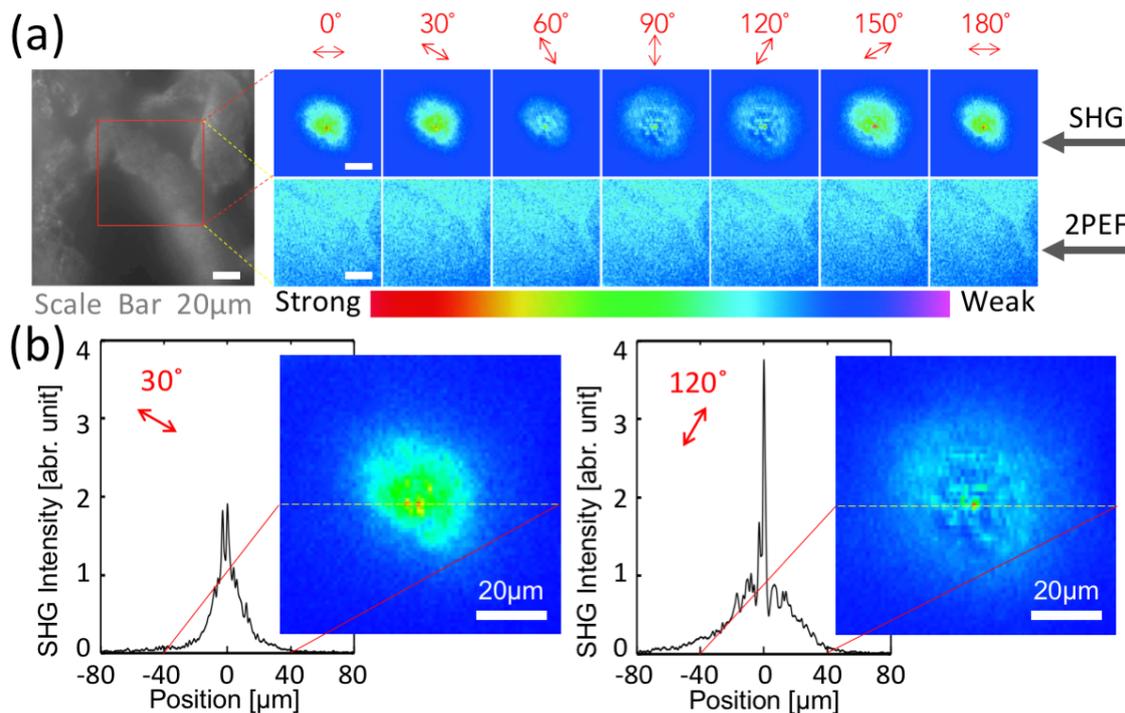


Fig. 5.30 高純度サクランの SHG 像と二光子励起発光像の入射偏光依存性。(a) 左のパネルは白色光で照明し、CMOS カメラ (Manufacturer : Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した顕微鏡像。右の上段は SHG 顕微鏡像、下段は 2PEF 顕微鏡像である。入射光波長は 800 nm、励起強度 6.8 mW、SHG 顕微鏡像と二光子励起発光顕微鏡像における積算時間はそれぞれ 300 s と 50 s であった。対物レンズの倍率: $\times 20$ ($NA = 0.46$)。入射光の偏光は、試料ステージと平行な方向を 0° として、図中に記した通りである。観測側は偏光は選んでいない。レーザーや光学系の安定度を確認するための測定で、 180° の測定は、 0° のそれと同じ結果を示しているが、これはこの偏光依存性の実験の最中に、実験条件に変動がなかったことを示すためのものである。(b) 入射光が 30° と 120° において最も強い SHG スポットの水平方向の強度プロファイル。強度積算をした領域は挿入図に示した黄色点線はプロファイルラインで、プロファイルラインの幅はワンピクセルである。信号のバックグラウンドは 1.1 以下で、迷光やノイズは 0.7 より小さい。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

図 5.30(a) では綿状の高純度サクランからの SHG スポットに注目しその励起光の偏光方向に対する依存性を調べた。SHG 像は偏光角が 0° 付近で一番強く 90° 付近で一番弱い。一方二光子励起発光の方は、入射偏光方向によらず一定の強度を持って

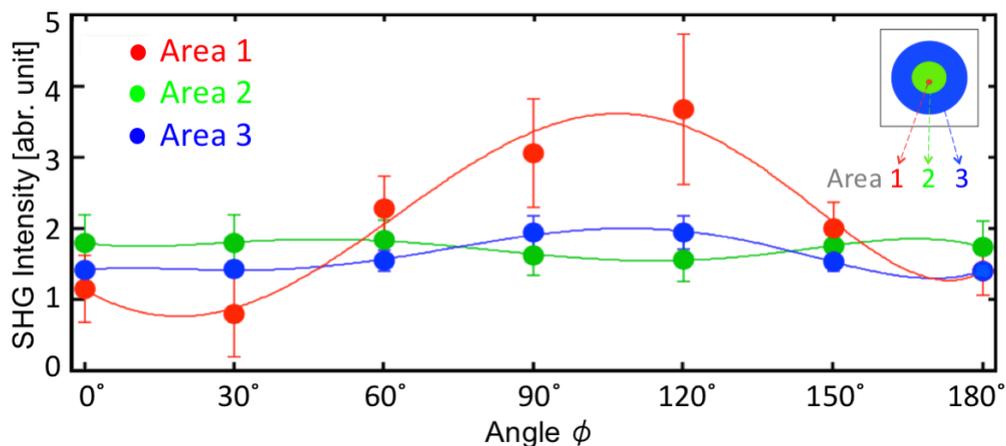


Fig. 5.31 Areas 1, 2 と 3 において入射光偏光における SHG 強度変化。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

いる。SHG 像に励起偏光依存性があるということは、SHG の選択則を考えると、このスポット内のサクラン分子が一方向に配向していることを示している。図 5.30(b) をよく見ると、SHG スポットの中心付近に $2\ \mu\text{m}$ 程度の大きさの範囲でさらに SHG が強い箇所があることがわかる。また SHG スポット全体の大きさも、偏光角度によって変化していることがわかる。これらの傾向は二光子励起発光の図には見られないので、入射光の屈折などによる見かけの像ではなく、実際にこの領域で SHG 発生効率に分布があることと考えられる。これらのことをより詳しく調べるために、SHG 強度のプロファイルを表示したのが図 5.30(b) である。図 5.30(b) 30° の SHG プロファイルにおいて、ブロードな SHG スポットの直径はおよそ $30\ \mu\text{m}$ である。それに対して、 120° の SHG プロファイルにおけるブロードな SHG スポットの直径はおよそ $60\ \mu\text{m}$ である。図 5.30(a) と (b) を見ると、ここでみられた SHG の強いサクランの領域は直径が $2\ \mu\text{m}$ (Area 1), $30\ \mu\text{m}$ (Area 2), $60\ \mu\text{m}$ (Area 3) の 3 つの領域から成り立っていることがわかる。他の SHG スポットも類似の構造を持つ傾向にあった。

5.6.3 サクランキャスト膜における SHG 顕微像

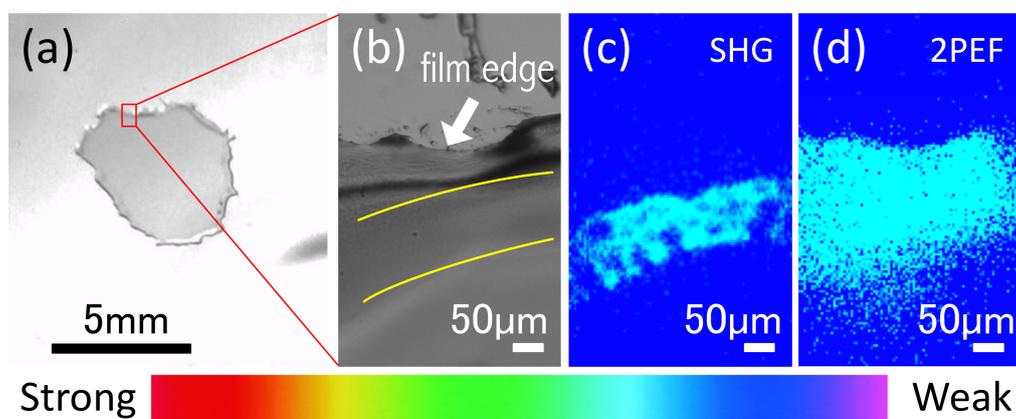


Fig. 5.32 上段はサクラン水溶液を $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過した後でシリコン基板上に垂らして乾かした膜における (a) 写真像、(b) 白色光で照射し CMOS カメラで撮った顕微像、(c) SHG 像、および (d) 二光子発光顕微像である。(c),(d) における入射光波長は 800 nm 、励起強度 7.0 mW 、SHG 顕微像と二光子励起発光顕微像における積算時間はそれぞれ 300 s と 50 s であった。対物レンズの倍率： $\times 5$ ($\text{NA} = 0.15$)。 (a) 中の赤枠は (b) の顕微像を撮る際の視野である。入射光はキャスト膜の縁部に照射した。ビームの照射範囲は (d) の二光子励起発光像に対応する。(b) の白色光照射の顕微像の黄色線で囲む部分は (c) で SHG が発生している部分に対応する。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

図 5.29 において、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過したサクラン溶液から作った膜の中央において SHG 発生は無視できる強度であった。しかし、膜の縁部からは図 5.28, 図 5.29 と図 5.30 で見たようなスポット状とは異なる様子の SHG が観察されることを見いだしたので、図 5.32 にそれを示す。図 5.32 では、 $0.45 \mu\text{m}$ の孔サイズのメンブレンフィルターでろ過した後でシリコン基板上に垂らして乾かした膜の縁部を観察した。図 5.32(a) は写真像、(b) は白色光で照射し CMOS カメラで撮った顕微像、(c) は SHG 像、および (d) は二光子発光顕微像である。図 5.32(c) の SHG 像においては、フィルター処理なしの図 5.29(c) のサクランキャスト膜と比べて鮮明な SHG スポットが観察されなかった。スポット状の SHG の核となるものの一部がフィルターにより取り除かれた結果と思われる。図 5.32(c) には、より連続的に SHG が発生している領域がみられる。この SHG の発生領域の形を図 5.32(b) の線形像に黄色い線で示したが、線形像はこの領域で特別な色の濃淡は示していな

い。連続的な SHG が観察され、その形状は円弧状である。しかし、この連続的な SHG の領域は完全には連続ではなく、数十 μm の大きさの SHG が出ない領域を無数に含んでいる。

5.7 電氣的刺激によるサクラン凝縮体の SHG 顕微鏡観察

ここでは、多様な構造を持つサクランを電気泳動でアニオンとカチオンを分離し、アニオンやカチオンを集中する場所を観察し、SHG 画像からサクラン分子が電氣的に異方的に配向する現象を追求することで、サクランの特異構造を見出す研究を行った。特に、同心円電極の場合、円心の電極における電荷密度が極めて大きいので、電極の正負によってその周囲に集まるアニオンやカチオンが効率よく配向できると考えた。またサクランは強電解質である硫酸基を大量にもつので、成膜したサクラン分子膜において、X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) の測定より、硫黄や窒素などの特定の元素を追跡することで官能基の集積状態を調べた。

5.7.1 電極装置

図 5.33 に示すように、0.5% の高純度サクランの水溶液を電極装置に入れ、3 つのサンプルを作った。また、電極の材質の影響を排除するために、電極の材料としてステンレススチールおよび金の両方について実験をした。また、針の先端の直径は約 $50 \mu\text{m}$ 、リングの内径は約 6.6 mm 、厚さは 1.0 mm である。電極のセットアップの写真を図 5.34 に示す。

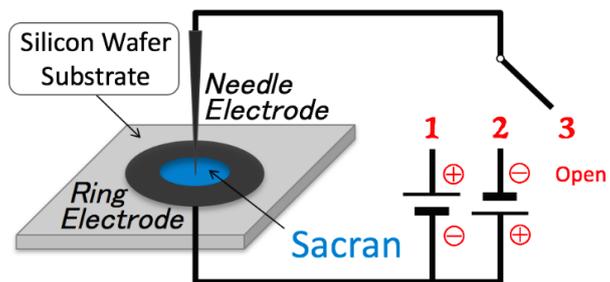


Fig. 5.33 シリコンウェハ基板の上に針型電極とリング電極で同心円コンデンサを作り、リングの中にサクラン水溶液を入れて、円の中心に針型電極を差し入れた。電極の材質はスチールと金の二種類を用いた。下段は三種類のサンプルの写真である。それぞれは回路のスイッチを1, 2, 3の位置に入れた状態で作ったものである。電極は完全に乾燥するまで入れたままであった。スケールのメモリは1 mm である。

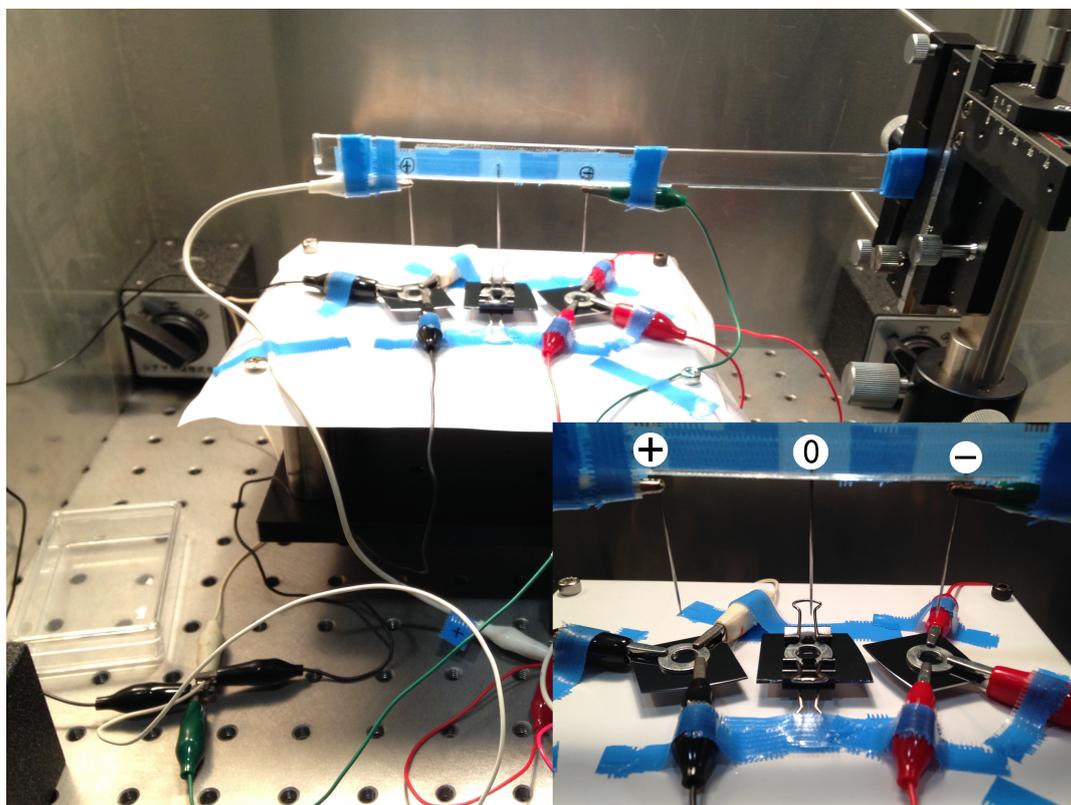


Fig. 5.34 電極装置の写真。

5.7.2 電気泳動における電流-時間変化

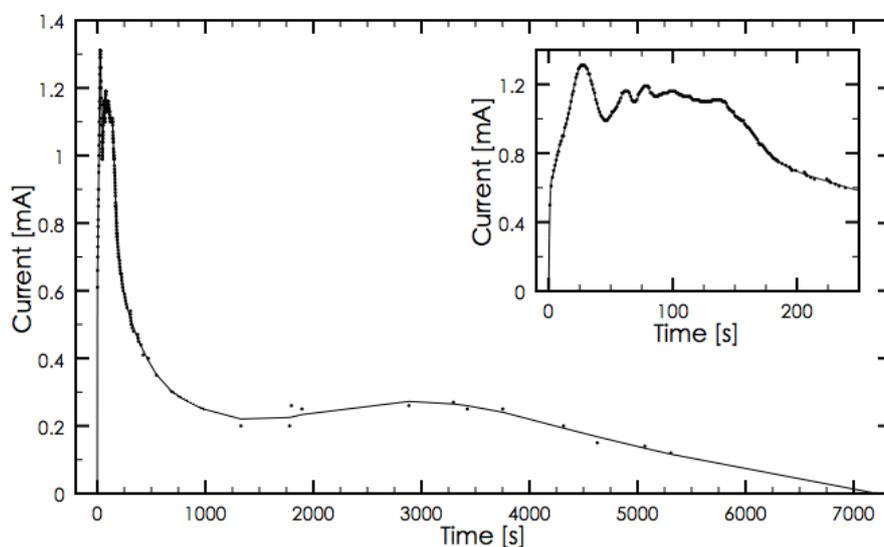


Fig. 5.35 電気泳動における電流-時間変化。印加電圧 6 V のときにおける電流の時間変化。スイッチオンにした瞬間の時間をゼロ秒と定義し乾燥するまで測定。挿入図：4分までの電流変化の拡大図。

図 5.35 は針を負極、リングを正極の電極とし、0.5%の高純度サクラン水溶液を3滴(約 70 μL) たらして電圧 6 V を印加したときの電流の時間変化を示す。サクラン水溶液を電極装置に入れた直後にスイッチオンにした。最初の数分間、負極の針の周囲から大量の気泡が発生した。水溶液は徐々に乾燥し、約 2 時間経過して完全に乾燥して、電流はゼロになった。図 5.35 において、1200 s までは大まかには指数関数のような減衰で 3000 s あたり到一个の構造を認めた。また、挿入図のように最初の 4 分間の電流変化を拡大してみると、単位時間あたりに電極に集まってくる電荷の量は増減を繰り返したことがわかった。

5.7.3 各電極下のサクラン乾燥体における SHG

図 5.36 の左側の九つのイメージはリングの内縁付近における顕微像で、右側の九つのイメージは針の先端周囲における顕微像である。(a, b, c, d, e, f) においては針が負極、リングが正極である。(g, h, i, j, k, l) においては針が正極、リングが負極である。(m, n, o, p, q, r) においては電圧をかけていなかった。それぞれ、

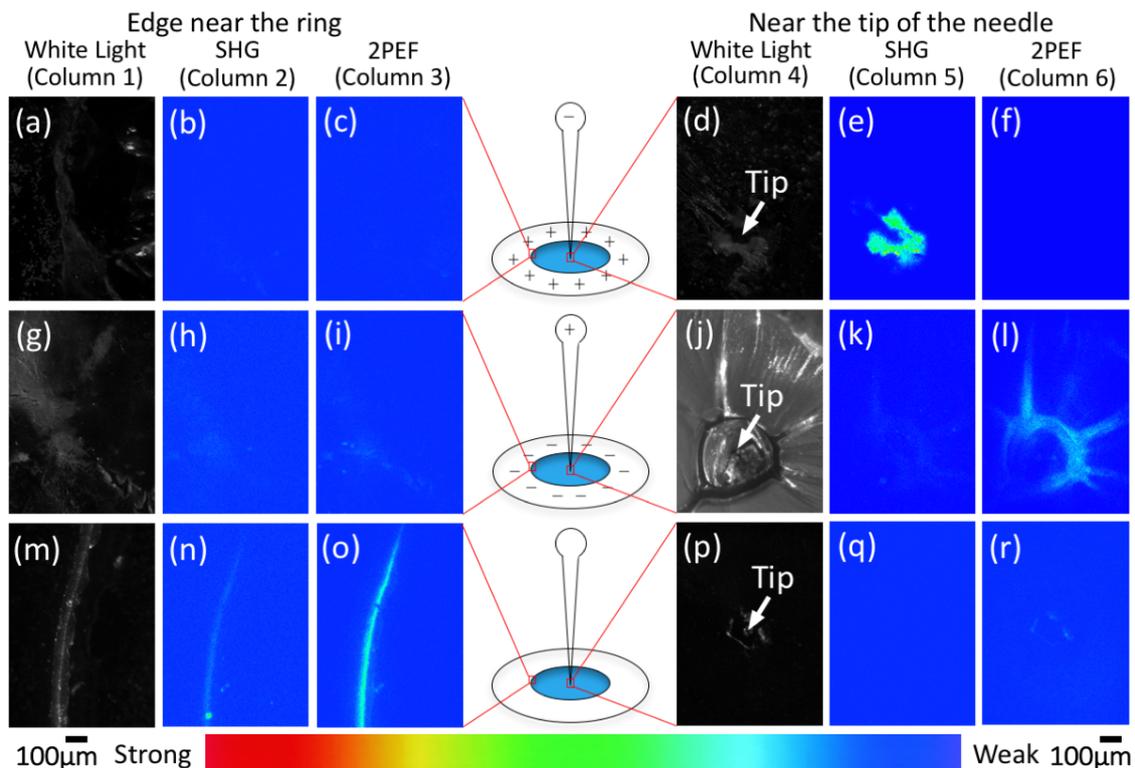


Fig. 5.36 左側の九つのイメージはリングの内縁付近における顕微像で、右側の九つのイメージは針の先端周囲における顕微像。(a, b, c, d, e, f)においては針が負極、リングが正極。(g, h, i, j, k, l)においては針が正極、リングが負極。(m, n, o, p, q, r)においては電圧をかけていなかった。(a, g, m, d, j, p)は白色光で照明し、CMOSカメラ(Manufacturer: Lumenera corporation, model number: Lu135M)で撮像した顕微像。(b, h, n, e, k, q)は波長400nmのバンドパスフィルターを用いて観察した試料のSHG像、それぞれ(a, g, m, d, j, p)に対応する。(c, i, o, f, l, r)波長438nmのバンドパスフィルターを用いて観察した二光子発光像、それぞれ(a, g, m, d, j, p)に対応する。SHG像と2PEF像計測における励起強度は20.1 mW、照射面積は6 mm²、積算時間は60 sである。対物レンズの倍率は×5 (NA = 0.15)。また、針の先端の直径は約50 µmで、その位置は白い矢印の挿入図で示している。

白色光照明における顕微像、SHG像、2PEF像の三種類の顕微像を示している。図5.36からわかるように、6Vの電圧を印加したとき、負の針電極の周辺に強いSHG信号(図5.36(e))が観察され正の電極付近においては、SHG信号が検出されなかった(図5.36(b))。そして逆方向電圧印加の場合には、正の針電極の周辺ではやはりSHG信号が検出されなかった(図5.36(k))が負のリング電極付近におけるSHG信号は極めて弱くてほとんど無視できる強度であった(図5.36(h))。また、電圧をかけていないサンプルのリング付近から数十µmサイズのSHGスポットがリングに沿って検出され(図5.36(n))針の周囲にはSHGは検出されなかった(図5.36(q))。一方、

正の針電極の周囲に強い二光子励起発光 (図 5.36(l)) が観察された。負の針電極の周囲には二光子励起発光が検出されなかった (図 5.36(f))。

次に、負の針電極のモードで電圧依存性を調べた結果、印加電圧を 4.5 V に下げても、負の針電極の周囲には SHG 信号が検出されたが、3.0 V と 1.5 V にまで下げると SHG 信号は検出されなかった。これらの結果を表 5.1 にまとめた。

また、電極の材質の影響を排除するため、電極の材料を金に入れ替え、図 5.33 と同じ方法で三種類のサンプルを作り、SHG 顕微鏡を用いて観察した。結果は、スチールと同様に負の針電極の周辺に SHG 信号が観察された。従って、観察の結果は電極の材料に依存しないことがわかった。

Table 5.1 各電極、電圧下のサクラン乾燥体における SHG と 2PEF の観察結果

	Near needle			Near ring			Voltage [V]			
	+	-	0	+	-	0	1.5	3.0	4.5	6.0
SHG	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes
2PEF	Yes	No	No	No	No	Yes	-	-	-	-

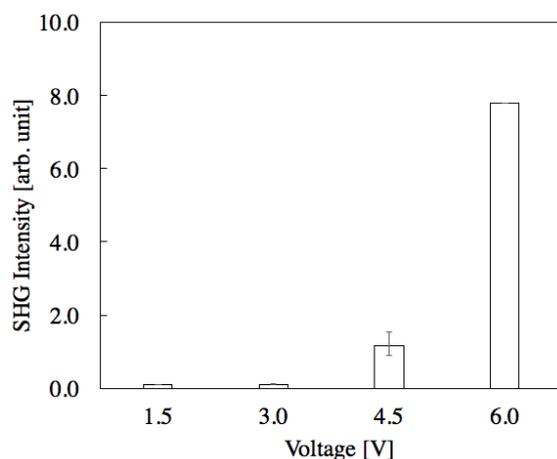


Fig. 5.37 各電圧で負の針電極周囲における SHG 信号の平均強度。

次に、0.5%の高純度サクラン水溶液を 1.2 μm と 0.45 μm 孔径のメンブレンフィルターでろ過した後、二種のろ液を用いて図 5.33 と同じ方法でそれぞれ三種類のサンプルを作った。同様に、負の針電極の周辺に SHG 信号が観察され、二光子励起発光が検出されなかった。なお、いずれのサンプルにおいても、針とリングの間部分では SHG 信号は検出されなかった。図 5.37 は SHG の活性化効率と印加電圧の

依存性を示す。3 V を閾値として、サクランの SHG の活性化が起こらないことがわかる。

5.7.4 電極下で成膜したサクランにおける SHG の入射光偏光依存性

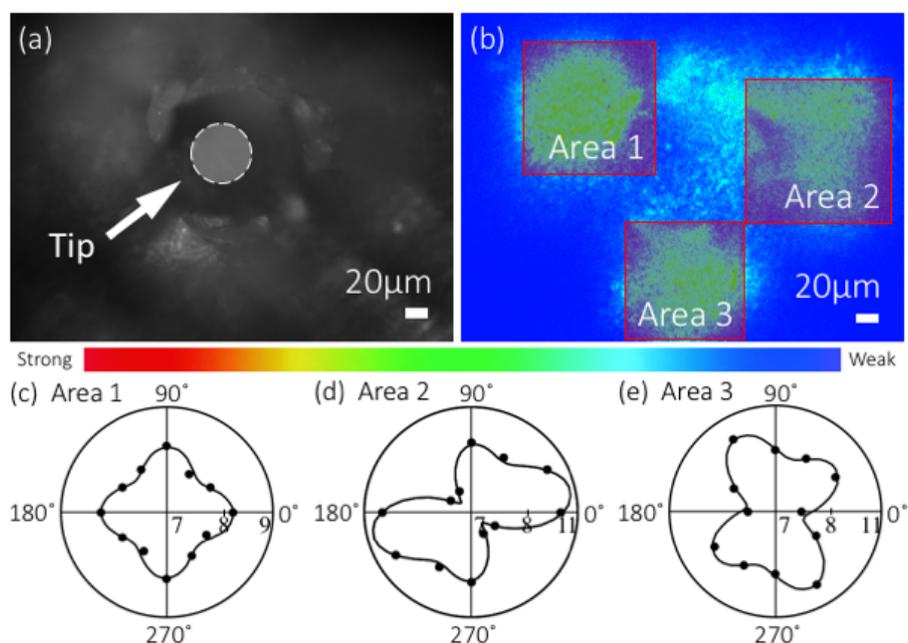


Fig. 5.38 負の針電極周囲における SHG 像の入射偏光依存性。(a) 白色光で照射し CMOS カメラで撮った顕微像。(b) SHG が集中的に発生する三つのエリアに分けた。それぞれの入射光偏光角度における SHG 強度の平均をとった。挿入図の赤い枠が SHG 強度平均をとった領域である。(c, d, e) 三つのエリアにおける SHG 強度の入射偏光依存性。黒点でプロットした。ただし、 210° から 330° までは 30° から 150° までの五つのデータのコピーである。

負の針電極周囲における非常に強い SHG に注目して励起光の偏光方向に対する依存性を調べた。SHG 強度が比較的強い三つの領域を Area 1, 2, 3 と名付けた。いずれの領域においても、SHG 信号は偏光角度によって変化した。各領域において SHG の発生効率も励起光の偏光角度に依存した。より詳しく調べるために、三つのエリアにおける入射光偏光に対する平均強度をとった (図 5.38(c, d, e))。

5.7.5 X線光電子分光法の測定結果

サンプルの各位置での構成元素を調べるために、X線光電子分光法 (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) (S-Probe TM 2803 model manufactured by Fisons Instruments Co., Ltd., USA) を用いて電界とかけたサクラン膜を観察した。その結果を図 5.39、図 5.40 および表 5.2 に示す。C と O はスペクトルを補正するために測定した。ここで、注目するのは、N, S と Na である。サクランの水溶液において、S は硫酸基としてマイナスの電荷、Na はその対カチオンであり N もカチオンと期待される。サクランアニオンがもつマイナスの電荷は主にカルボン酸 (22 mol%) と硫酸基 (11 mol%) [52, 53] 由来と考えられる。S を追跡すればアニオンが集合する場所が特定できる。また、Na イオンの原因でサクランが SHG 活性化した可能性が考えられるので、Na が存在する場所も調べた。サクランにおいて N の量は微量であるが、サクランであるなら含むべき元素である。表 5.2 の結果をみると、試料上どの場所においても N が存在した。一方負の針の電極の場合にその周辺部分にのみ S がなかった。また、電極の有無に関係なく、いずれの場合でも、エッジには Na が存在しないことがわかった。印加電圧の有無にかかわらず、Na はエッジ付近で検出されなかった。各元素の XPS 測定結果は図 5.39 と図 5.40 に示す。

Table 5.2 XPS の測定結果

	Without electrode		By electrode (ring: +, needle: -)	
	Center	Edge	Center	Edge
C	Yes	Yes	Yes	Yes
O	Yes	Yes	Yes	Yes
N	Yes	Yes	Yes	Yes
S	Yes	Yes	No	Yes
Na	Yes	No	Yes	No

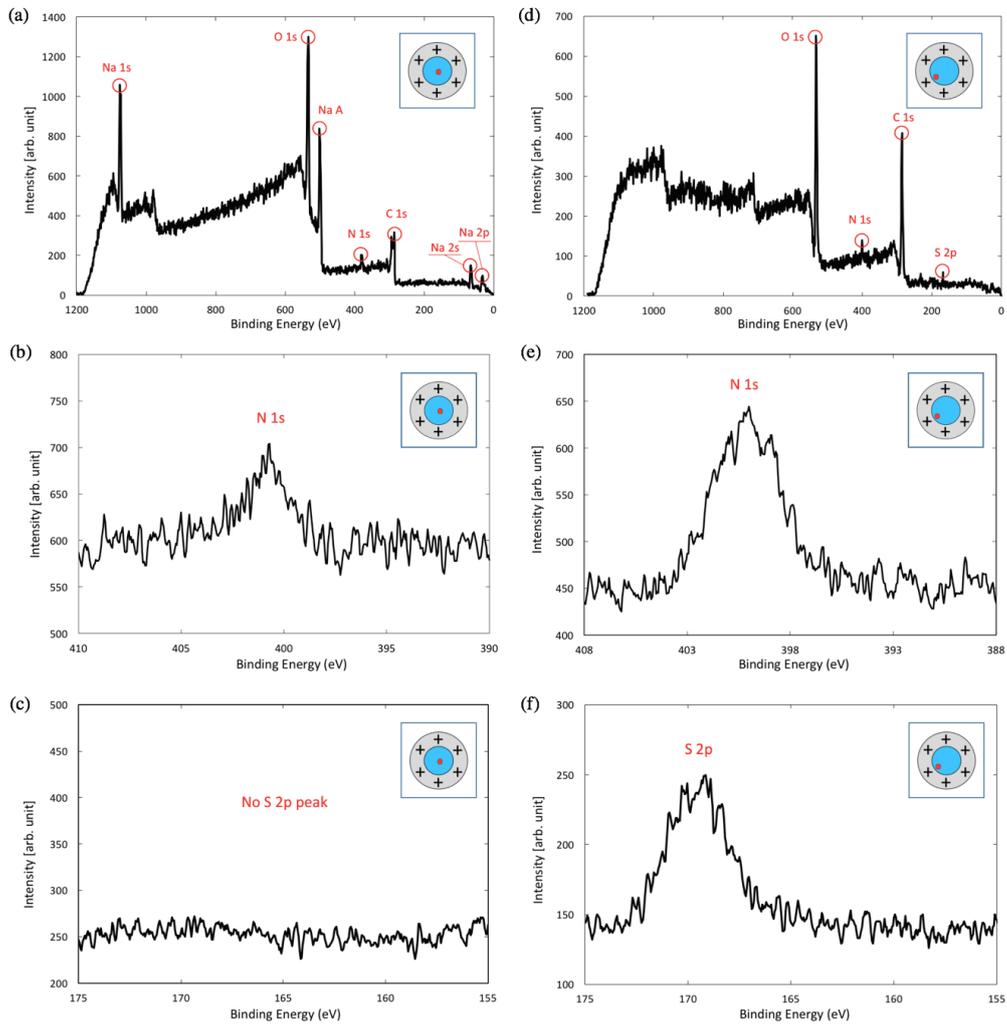


Fig. 5.39 (a-c) 負電極の針の周囲における XPS のスペクトル。(b) N の 1s 軌道における結合エネルギー (binding energy) 付近でナロースキャン (narrow scan) の結果。(c) S の 2p 軌道における結合エネルギー付近でナロースキャンの結果。(d-f) 正電極のリング付近における XPS のスペクトル。(e) N の 1s 軌道における結合エネルギー付近でナロースキャンの結果。(f) S の 2p 軌道における結合エネルギー付近でナロースキャンの結果。

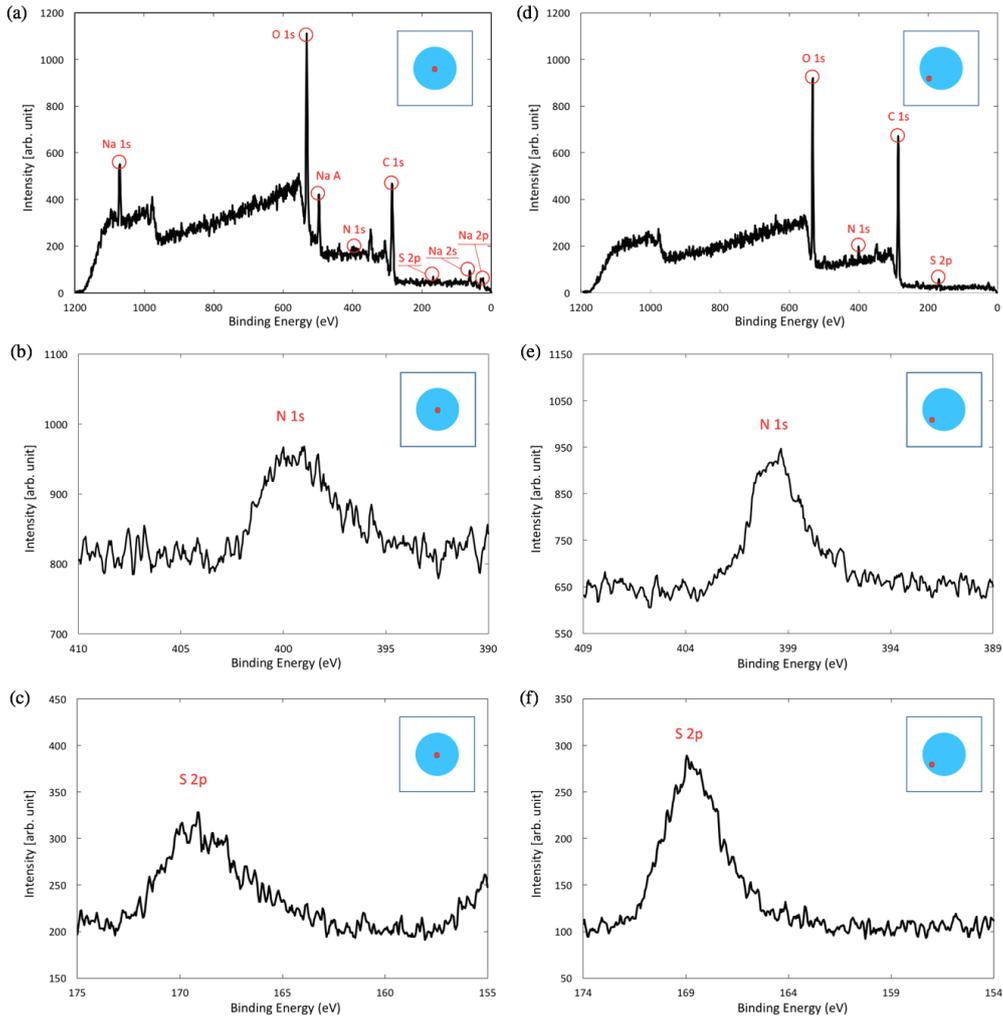


Fig. 5.40 (a-c) 電極かけていないサクランキャスト膜の中心部分における XPS のスペクトル。(b) N の 1s 軌道における結合エネルギー (binding energy) 付近でナローズキャン (narrow scan) の結果。(c) S の 2p 軌道における結合エネルギー付近でナローズキャンの結果。(d-f) 電極かけていないサクランキャスト膜のエッジの部分における XPS のスペクトル。(e) N の 1s 軌道における結合エネルギー付近でナローズキャンの結果。(f) S の 2p 軌道における結合エネルギー付近でナローズキャンの結果。

5.8 考察

サクランのSHG観察の実験では、励起光の最大パワー密度は 8.6 mW/mm^2 であった。損傷閾値を確認するために、同じ光学設置で励起光のパワー密度を 60 mW/mm^2 まで上昇させたが、サンプルに痕などの損傷はCMOSカメラでは検出できなかった。したがって、入射光による試料の損傷は、本研究の範囲内では無視できると考えられる。

次に、このシステムを用いて高純度サクランを観察した。数十 μm 大きさの粒子状のSHG像が観察された。サンプルとして使用した高純度のサクランは液晶状態から乾燥してできたものなので、サクランの水溶液の濃度の増加によって、サクランは棒状組織体から「骨格」を形成すると推測され、乾燥しているサクランも「骨格」の構造を残していると予想していた。試料に対する観察角度を変えると、発生するSHGの強度も変化すると予想した。それを検証するため、次に高純度サクランの多角度観察を行ったのが図5.15である。

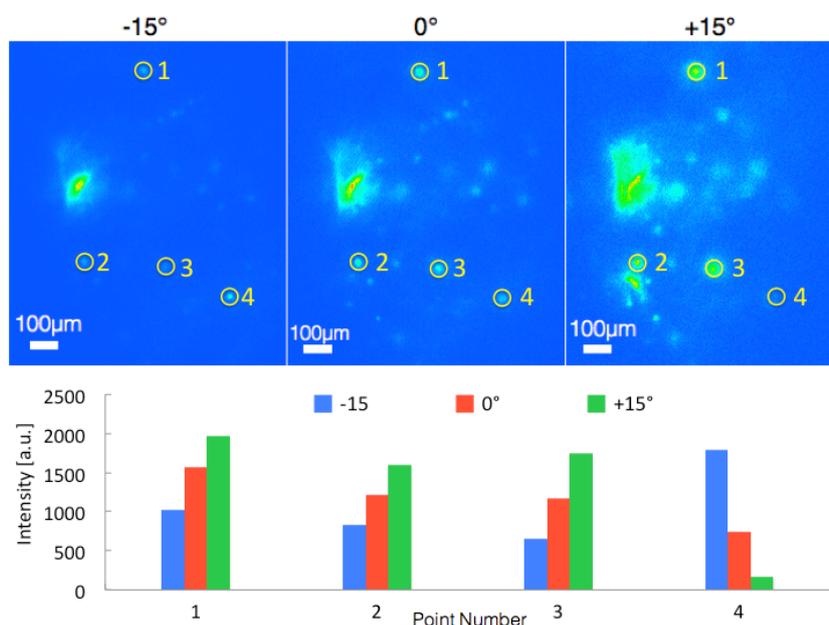


Fig. 5.41 高純度サクランの多角度観察における SHG 光強度の変化

入射光パワー、観察位置、積算時間、インテンシファイアのすべての条件を同一にして、試料を対物レンズに対する観察角度を変えて観察した。その結果は、同じ

位置の SHG 光の強度が強くなったり弱くなったりすることがわかった。図 5.41 に示したのは、高純度サクランの多角度観察で特徴がある四つのポイントにおける SHG 光強度の変化である。その原因は位相整合条件によるものか、液晶ドメインの配向によるものと考えられる。また、SHG が発生することによって、サクラン分子が配向し、二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ をもつことがわかる。

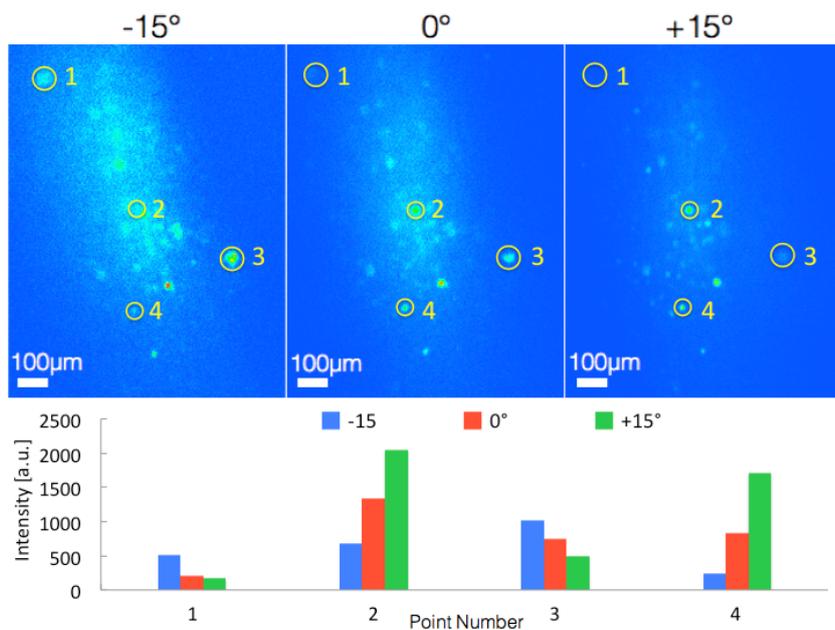


Fig. 5.42 サクラン薄膜表面の多角度観察における SHG 光強度の変化

さらに、サクラン薄膜表面と薄膜縁部に対して、SHG を観察した (図 5.18、図 5.23)。まず、サクラン薄膜表面から SHG が発生したことは確認した。その結果は、高純度サクランの SHG 顕微像と同じように数十 μm の粒子状の SHG 像となっていた (図 5.18)。そして、試料の対物レンズに対する観察角度を変えて観察した。同じ位置の SHG 光の強度が強くなったり弱くなったりすることがわかった。図 5.42 に示したのは、サクラン薄膜表面の多角度観察で特徴がある四つのポイントにおける SHG 光強度の変化である。高純度サクランの観察結果と同じように、この SHG の強度の変化は位相整合条件によるものか、液晶ドメインの配向によるものと考えられる。次に、一枚の四角形のサクラン薄膜の三つの辺をそれぞれ観察した (図 5.23)。同じ薄膜、同じ入射光パワーであっても異なるエッジからいずれも SHG を検出されていないことがわかった。ただし、エッジから強い発光が発生したことが確認さ

れた。高純度サクランやサクラン薄膜表面を観察したときの入射光パワー（約 8.6 mW）より低い入射光パワー（約 4.1 mW）であっても強い発光が発生した。最後に、高純度サクランやサクラン薄膜表面の観察と同じように、サクラン薄膜のエッジは対物レンズに対する観察角度を変えて観察した。観察角度を変えても、SHG を検出されていないが強い発光が発生したことがわかった。

以上の結果から、数十 μm 大きさの粒子状の SHG 像は液晶ドメインであると推定できる。その理由は、サクラン薄膜の厚さは 30 μm となっていて、サクラン分子の伸び切り長は 50 μm の直棒として振る舞うから、サクランの直棒は面内方向に平行して、分子鎖は 2 次元に配列している。特に、サクラン薄膜のエッジでは直棒の端となる部分がある。したがって、SHG は液晶ドメインを構成するサクラン直棒の側面から発生する可能性が大きい。

ここでは、図 5.28(c)、図 5.28(f)、図 5.29(c)、図 5.30(a)、図 5.32(c) でみられた、大きさ数十 μm の SHG スポットの起源について考察する。これらのスポットは高純度のサクラン塊 (図 5.28(c))、繊維 (図 5.28(f))、およびサクラン溶液より作ったキャスト膜 (図 5.29(c)) で観察されたものよりも、図 5.32(c) で観察されたものの方が単位面積あたりの個数がずっと少なかった。図 5.32(c) のキャスト膜を作るにあたっては、あらかじめサクラン溶液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過しており、この濾過によって取り除かれうるスイゼンジノリの細胞壁などの不純物や大きめのサクラン分子などが SHG スポットの原因になっていると考えられる。

SHG スポットの入射偏光依存性 (図 5.30) を見ると、スポット内部の SHG 光強度の偏光依存性は一様でないことがわかる。すなわち、SHG 像の中心にある直径が 2 μm 程度の SHG が強い領域は、 120° で一番強く、 30° で一番弱い。一方、 0° と 30° における SHG スポットの直径はおよそ 30 μm である。それに対して、(d) 90° と (e) 120° における SHG スポットの直径はおよそ 60 μm である。このことは、さらに直径 30 μm と直径 60 μm の偏光依存性の異なる領域が重なっているということがわかる。水溶液に溶けているサクラン分子が液晶化への相転移に移行するとき、物理的刺激によって核となる微小な相を生成させる必要がある。水溶液の中で細胞の殻などの不純物が核生成部位となって、不均質核生成 (heterogeneous nucleation) したと考えられる。その核がきっかけで水溶液濃度の過飽和によって核の周囲に液晶ドメインできたと推測している。また、綿状や繊維のサクランの場合は、SHG 顕

微像からみると、核をはじめ異なる面積の液晶ドメインが同芯球殻状に重なり、各液晶ドメイン層は各自の配向をもっていると考えられる。30 μm の部分の一つの液晶ドメインになって、分子の配向は同じ方向に揃えている。さらにその外側にもう一つ大きさ 60 μm 環状の液晶ドメインができて、分子の配向は別の方向に揃っていると考えられる。この初期の核形成については、図 5.43 のようなイメージが一つの候補であると考えられる。低濃度のサクラン水溶液においては、各サクラン分子は球状であるが、濃度上昇とともにサクラン分子は球状から柔らかな糸状に伸びることはすでに知られている (5.43(a), (b)) [58]。さらに濃度があがると、サクラン分子は棒状組織体になることが知られている [57] が、自己組織化して棒状組織体になる前の濃度において、サクラン水溶液の中に不純物や分子量あるいは体積の大きいサクランが含まれていると、他の箇所よりは低濃度で液晶前駆体が形成される (図 5.43(c))。[53] この前駆体の大きさが、図 5.30(b) で見られる中心の鋭い SHG ピークの幅 2 μm に相当すると考えられる。図 5.30 において、中心の部分から出る SHG が明確な入射偏光依存性を持っているのは、この液晶前駆体において分子が配向しているからだと思われる。これより上の濃度ではこの前駆体の周りにサクラン分子が配向して凝縮し層をなすと考えられる。各層が異なった分子方位を示す理由は明らかではない。

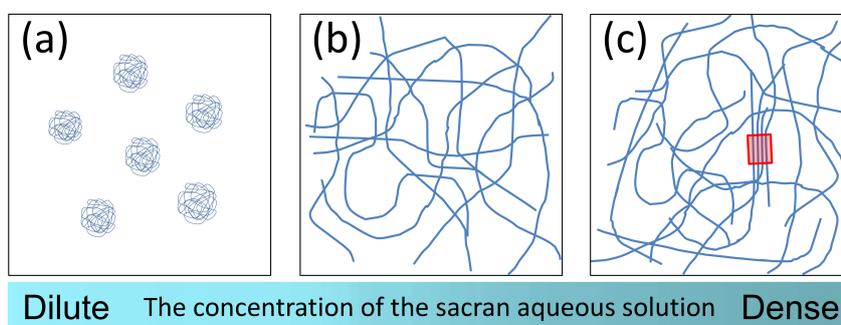


Fig. 5.43 (a) 低濃度のサクラン水溶液において球状のサクラン分子. (b) 濃度上昇とともにサクラン分子は球状から柔らかな糸状に伸びる.[58] (c) 不純物や大きいサクランによる液晶前駆体。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

次にキャスト膜における SHG 像 (図 5.32(c)) に注目する。すべての試料で、図 5.28(c)、図 5.28(f)、図 5.29(c)、図 5.30(a) に見られたのよりも広い範囲 (数百 μm 以上) で連続的で強度変化が小さい SHG が見られた。このより連続的な SHG はしか

し、キャスト膜の全範囲で観察されるものではなく、キャスト膜の縁から数百 μm はなれた、縁の線と平行な幅数百 μm の帯状の領域に見られる。ただし、SHG 強度は単純な変化ではなく、数十 μm の径の穴があいたような模様を示している。これらの SHG の発生の様子は、サクラン水溶液を濾過したフィルターの孔径には依存しないようである。この SHG の発生においても、中心対称性の崩れがあるわけであるから、サクラン分子が配向していると考えられる。

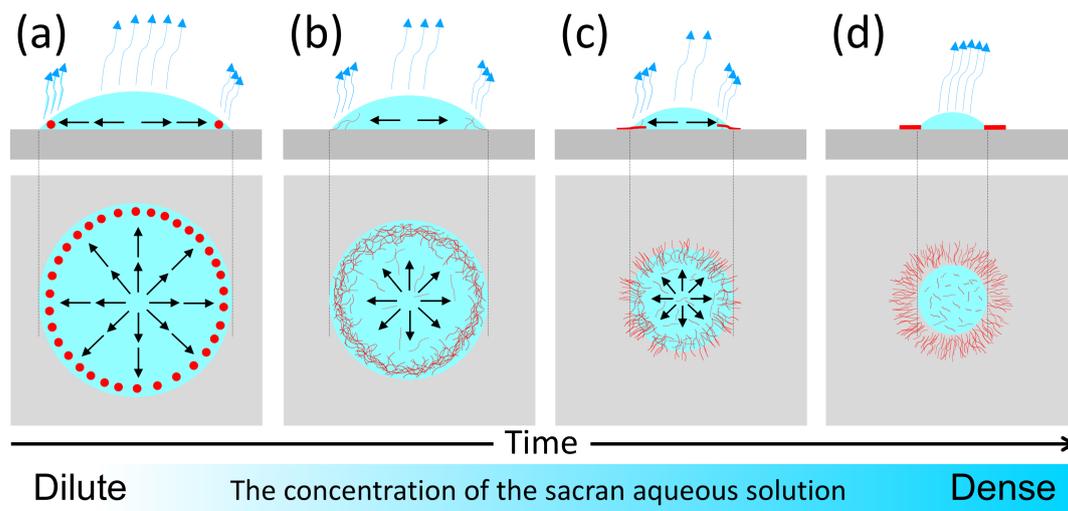


Fig. 5.44 シリコン基板上においてサクラン水溶液は液滴から乾燥につれ、分子が配向するメカニズムの1つの候補。(Reprinted with permission from ref [62]. Copyright 2017 by the Optical Society of America. <https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-34-2-146>)

サクラン分子がキャスト膜の中の特定のこの位置で配向する原因の1つの候補として、コーヒーリング効果 [63] が挙げられる。サクラン水溶液をシリコンウェハーに滴下したとき、水滴の縁部分が表面張力による曲率のため、水滴中で最も表面積が大きく、水滴から水が蒸発する速度が最も速くなる。サクラン水溶液の水滴は濃度が一様でないため、表面張力の勾配が生じ、その表面張力の不均一性により、水滴中の水はマランゴニ対流 (Marangoni convection) を発生し、縁に向けて流れていく。それとともにサクラン分子も水滴の縁に引っ張られていく (図 5.44(a))。球状の粒子と楕円体状の粒子とでは、水滴が乾くときの粒子の運動速度の場所依存性が異なることが知られている [64]。一方で、サクラン分子はある濃度以上で球状から棒状に形が変化する (図 5.44(b)) [58]。したがって、サクラン分子が球状から棒状に変化すると、移動の加速度を生じ、それに相当する力が加わることが考えられる (図

5.44(c))。その力により、膜内の一部の領域でサクラン分子が配向することが考えられるが、定量的な裏付けはない。結局、縁付近で糸状のサクラン分子が中心に向いて並べるようになり、巨視的には非対称性をもつような構造になって、SHG が発生したと考えられる (図 5.44(d))。

もう一つの候補として、SHG の起因である配向した分子部分が単純に膜の厚さに依存すると考えることもできる。一般には、高分子の水溶液が乾燥した後、その形状は中央が凹んだパンケーキ型になる [65, 66, 67]。本研究で製作したサクランのキャスト膜も同様に、中心は薄くて虹色の干渉パターンが現れ、エッジは厚くて干渉パターンが現れなかった。サクラン分子は液晶ドメインになるには、ある一定の厚さが必要と推定されているので、この違いで、図 5.29 の SHG が現れた可能性も否定できない。

両性電解質のサクランを電極につけると電解分離され、正の電極にアニオン、負の電極にカチオンが集まっていく。図 5.35 の挿入図においてイオン電流の値が細かく振動した原因は、以下の二つの候補が考えられる。候補 (i)、最初の数分間において、負極の針の周囲からの気泡が針と溶液の接触を遮断し、気泡がやぶれたら針と溶液が再び接触するようになる。このことによって、針と溶液の接触面積が変化した。このことにより、最初の数分間において電流が図 5.35 の挿入図のような変化を起こした。候補 (ii)、物質の粘性や大きさによって電気泳動での移動速度が異なることが考えられる。水溶液にサクランカチオン、サクランアニオンなどそれぞれ異なる粘性と大きさをもつ物質が存在し、各物質の移動速度の関数や緩和時間が異なり、異なる緩和時間による電流の時間変化のカーブを重ねると図 5.35 の挿入図のようなカーブになる可能性がある。

表 5.1 に示すように負の電極の周辺から SHG 信号が観察されたが、正の電極の周辺からは観察されなかった。このことより、SHG の起源は正電荷をもつサクランカチオンによるものと推定できる。針形の電極の周辺における SHG が非常に強い原因は、リング電極と比べて、針周囲における電束密度が非常に高いから、針に集まってきた正電荷をもつサクランカチオンの密度も非常に大きいためと考えられる。一方、リングの内縁では、電束密度が低いから、イオンを引っ張るポテンシャルエネルギーも低い。たとえ同じ量の分子が集まったとしても、リング付近における分子の密度も針周囲の密度よりはるかに少ない。当然、単位空間あたりにそういう巨

視的に非対称性をもつ構造が多ければ多いほど、SHG の発生効率も高く、SHG 信号の強度が強い。

また、図 5.38(b) のように、針の負電極の周囲の SHG 活性化は不均一である。例えば、Area 1 と Area 3 の間に SHG が観察されなかった。その原因は以下のように考えている。スイッチ入れた最初の数分間は、針の負電極から気泡が発生した。数分間経って、自由に流れる液体がほとんど消えて、気泡も止まった。配向が行えるのは最初の数分間だけで、気泡はサクラン分子の配向を妨げた。

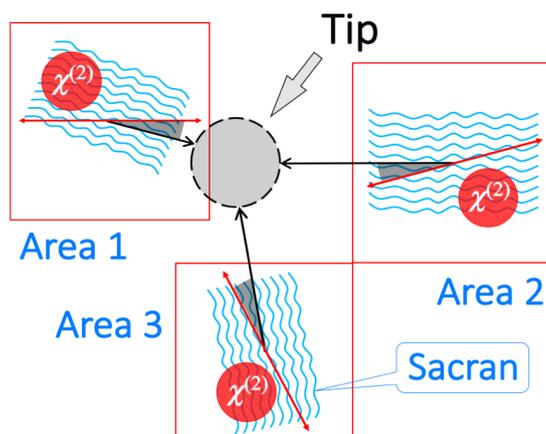


Fig. 5.45 負の針電極付近のサクラン分子配向の概略図。サクラン分子（青い波線）は針の方向に向いて配向している。各領域の電位勾配ベクトルの方向を黒い矢印で示す。赤い矢印は、最も強い SHG 応答の入射偏光方向を示す。入射電場の偏光はこの方向のとき、 $\chi^{(2)}$ が最大になる。

次に、負極の針の周囲における SHG の入射光偏光依存性を考察する。まず、図 5.38(c, b, d) の各 Area の偏光依存性パターンを見ると、各 Area は複数の配向したドメインが重なったものと考えられる。いずれの Area においても、SHG 強度が強くなった入射光偏光角度と針の作るポテンシャル勾配ベクトルのなす角は $\approx 20^\circ$ となっている。このことから、針電極周囲における分子配向は指向性をもっていると考えられる。電流の時間変化の結果を加えて、サクラン分子に電圧がかけられる最初の数分間において、サクラン分子は針電極によるポテンシャルエネルギーで、針に向った加速度をもち、図 5.45 のように移動と同時に針に向いた方向に配向したと考えている。結局、サクラン分子の集合体は巨視的には非対称性をもつような構造になって、SHG が活性化したと考えられる。

また、XPS の測定結果を加えて考察する。まず、水溶液中では、ナトリウムは正

の電荷をもつ Na^+ として存在するから負電極に集まると考えられる。XPS の測定結果も負電極にナトリウムが集まっていることを示している (表 5.2)。一方、電圧がかけられていないサクラン薄膜においても Na が中心に集まるが、そこからは SHG が出なかった。また、大量の Na^+ を投入し、電圧をかけずにサクラン水溶液を乾燥させた膜からも SHG は観察されなかった。よって、 Na^+ はサクランにおける SHG の誘因ではないと判明した。また、電極の有無に関係なく、膜の中心に Na が存在する原因は、成膜するとき、水が蒸発してもナトリウムはすぐに析出せずに、水の蒸発に連れて中心に移動して行き、最後、中心部の近くで析出濃度に達して析出したと考えられる。次に、負の針電極に集まったサクランの集合体からは S が検出されないことが分かったことから、そこには硫酸基のほとんどない成分が集合したと考えられる。天然の硫酸化多糖類にはそのようなことがあり、例えば紅藻由来のカラギーナンは硫酸基多く持つが、 β -カラギーナン (β -carrageenan) [68] といわれる硫酸基の無い成分も存在する。他方、N をもつグルコサミン (glucosamine) やムラミン酸 (muramic acid) をもつ糖残基のカチオンと結合して正電荷帯電体として負の針電極に集まり、配向して SHG が活性化したと考えている。一方、正のリング電極付近にも N が検出されたが、その N もグルコサミンやムラミン酸によるものと考えられる。サクランに含まれる N (0.30%) の量は S (2.07%) と比べて極めて少ない [52, 53]。グルコサミンやムラミン酸は大量の硫酸基やカルボン酸をもつ糖残基と結合して、正味の電荷はマイナスのチャージをもつので、硫酸基やカルボン酸が正電極に向かって移動したと考えられる。

最後、サクラン水溶液のキャスト膜にみられる粒子状 SHG マイクロスポットが $0.45 \mu\text{m}$ 孔径のフィルターでろ過することで消えた。これについて、図 5.46 に示すように、以下の非排他的な二つの可能性があると考えている。候補 (1)、SHG が発生する集合体そのものがフィルターでカットされた。候補 (2)、SHG が発生する集合体がろ過する時の圧力で解体された。その解体されたものは溶液を一緒にろ過し、解体することによって SHG 活性を失った。一方、電極の実験で、サクラン水溶液を $0.45 \mu\text{m}$ 孔径のフィルターでろ過しても、電極の刺激で SHG が出たことが観察された。この結果を踏まえて改めて考察すると、どちらの可能性は真であるかは確認できないが、両方が起こっている可能性もある。

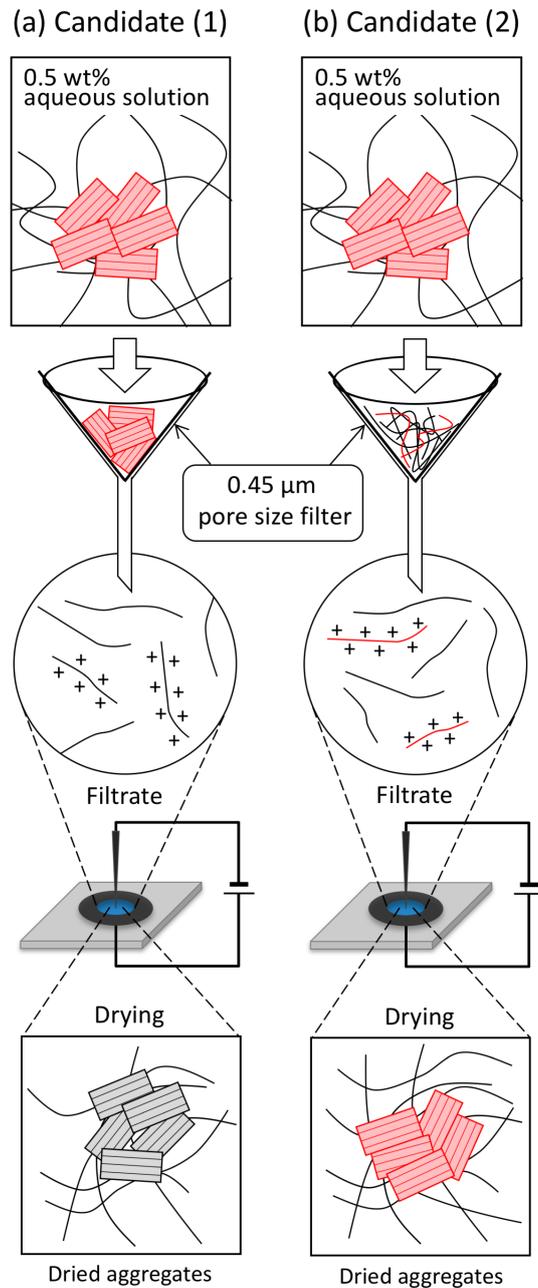


Fig. 5.46 電氣的刺激によるサクランろ液から成膜したサクランキャスト膜における SHG 活性化の模式図。(a) SHG が発生する集合体そのものがフィルターでカットされた。電氣的刺激の下での生成した SHG 活性集合体は、ろ過前の SHG マイクロスポットを生成する集合体とは別物である。(b) SHG が発生する集合体はろ過するときの圧力でより小さな分子に分解された。解体していない集合体やより大きな分子は、フィルターによって除去された。ろ過後の解体されたものは負電極の周りに集まり、SHG は再び活性化された。

以上をまとめると、フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムを用いて超巨大分子サクランにおける巨視的に非中心対称に配向する部分を SHG 像として観察した。綿状、繊維状および薄膜状の高純度サクランからは、数十 μm の大きさの粒子状の SHG スポットが観察された。また、同じ位置であっても観察の角度を変えると、粒子状の SHG 像の強度も変化したことがわかった。また入射光の偏光に対する像の変化により、この集合体の中でのサクラン分子は異方的な構造をとることがわかった。SHG 顕微像は多層構造を持ち、各層の偏光依存性が異なることからみると、各液晶ドメイン層は各自の配向をもっていると考えられる。一方で、サクランの水溶液を用いて作ったキャスト膜における SHG の発生効率が部位によって異なることがわかった。その原因の候補の 1 つとして成膜するとき水溶液の表面張力によって、水分の蒸発とともに溶液の濃度分布が異なったことが考えられる。SHG スポットの起源について、不純物または大きなサクラン分子、またはサクランカチオンに囲まれたサクランアニオンによる液晶前駆体であると考えられる。その SHG の起源をするために、同心円電極で作ったサンプルの SHG 観察によって、サクラン分子が負の電極近傍だけにおいて SHG を発生することがわかった。特に、針電極の周囲は電場強度が高く、非常に強い SHG が観察された。このことから、サクラン集合体における SHG の起源はサクランカチオンによるものと判断した。また、負の針電極の周囲における SHG イメージの偏光依存性を観察した結果は、サクラン分子が負の電極の周囲に、針電極の中心に向けて配向したことを強く示唆した。最後に、XPS の結果から、負の針電極に集まったサクランの集合体は硫酸基をもたない成分で主に構成されていると推測した。

第6章 米のSHG顕微像観察

サクランとの連想により、植物の種子に存在する多糖類であるデンプンに着目した。デンプンの構成単位はサクランより単純であり、グルコースだけである。一方、植物の種子に存在するデンプンは種子の構造や品種によって、異なる二次の非線形光学応答を示すことがあると考えている。

本研究では、未発芽のうるち米 (*Oryza glutinosa* cv. Koshihikari) ともち米 (*Oryza glutinosa* cv. Shintaishomochi) 種子の断面及び胚の糠側から光の二次高調波の強度画像を観察した。光の二次高調波発生顕微鏡法は、アミロペクチンなどのような非中心対称の分子成分を選択的に検出することができる。米種子の胚乳からのSHG強度分布を観察し、二種類の米において胚と胚乳の間にある粉砕細胞層 (crush cell layer) におけるSHG強度分布が異なることを見だし、これから、アミロペクチンとアミロースの分布が異なることを推測した。また、胚の糠側はSHGスポットを示した。胚乳のSHGはアミロペクチンによるものであるが、胚の糠側のSHG強度スポットはグルコースの結晶であることを推定した。赤外分光法 (Infrared spectroscopy) で区別がつかない単糖やデンプンなどの糖類を新たな手法で観察できた。

6.1 米種子断面におけるSHG観察の背景

SHG顕微鏡法は、非中心対称性をもつ構造をマッピングすることができる。デンプンの構成単位である単糖D-グルコピラノースは中心対称性を持たない構造をもった分子であるため二次の非線形感受率をもち、SHG許容である。D-グルコース、D-フルクトースとスクロースから和周波発生 (Sum Frequency Generation, SFG) シグナルが検出され、二次非線形応答を示すことがわかっている [69]。一方、デンプンはグリコーゲン、アミロペクチン、アミロースなどさまざまな種類があり、アミ

ロペクチンはタンデム・クラスター構造、アミロースは一重ラセン構造など構造が異なる [70, 71, 72, 73, 74]。その中で、アミロペクチンのタンデム・クラスター構造は、その高次構造が巨視的な非対称性をもつため、単糖 D-グルコピラノースの非線形分極が同じ方向に配向し、巨視的に大きな非線形分極となり、強い SHG 光を発生する [18, 75, 76]。一方、アミロースの一重ラセン構造においては、単糖 D-グルコピラノースの非線形分極は互いにキャンセルし、巨視的に非線形分極をもたないので、SHG 光が発生しない [77]。

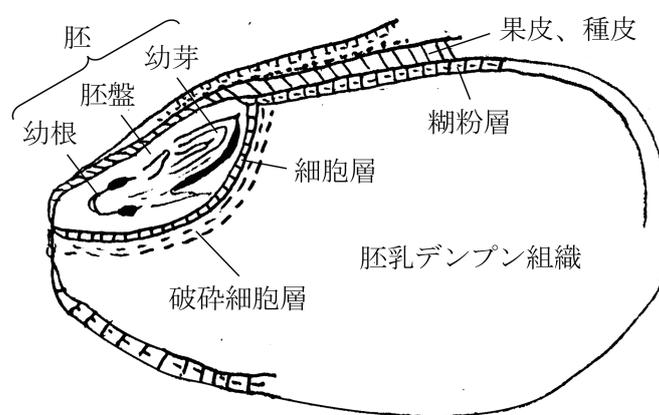


Fig. 6.1 米種子の断面図 [78]

デンプンは米における主な構成成分であり、過去の研究では、米の粒における二次非線形活性について、SFG 顕微法を用いたもち米種子の断面におけるデンプンの分布を観察したことが報告されている。その SFG シグナルはもち米の粉碎細胞層において増強したことが報告された [79]。図 6.1 に示すように、粉碎細胞層は、胚と胚乳との間にある約 100 μm の幅をもつゾーンである。粉碎細胞層の細胞は胚乳内の細胞よりも小さく、澱粉顆粒のサイズもはるかに小さい [78]。しかし、もち米の粉碎細胞層における SFG 信号増強の原因はまだ明らかになっていない。分子構造の中心対称性の破れによるものか、分子振動共鳴による増強かを調べるため、本研究では、非中心対称性に敏感な SHG 顕微鏡法を用いて 2 種類の米種子を観察した。

一般的に、デンプンの分布を調べる方法として、ヨウ素デンプン反応が知られて

いるが、ヨウ素試薬は試料に侵入し、不可逆的な変化を起こすという短所がある。したがって、二次の非線形光学顕微鏡によるデンプンの空間分布を観察することは非破壊的で非常に良い方法である。デンプンの中のアミロペクチンは、巨視的な非中心対称な構造をとっているため、二次の非線形感受率をもち、SHGが発生することが報告されている [18, 76]。そこで、本研究では、フェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡を用いて、未発芽のうるち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Koshihikari) ともち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Shintaishomochi) の種子における SHG 画像を得た。

6.2 米種子における SHG の観察方法

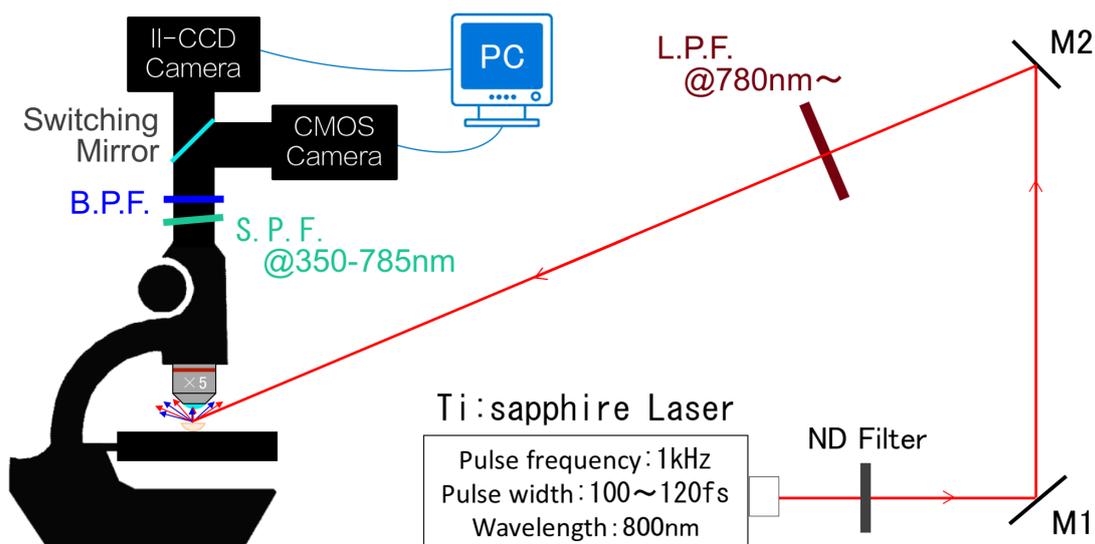


Fig. 6.2 米を観察する実験配置。CMOS カメラ (Lumenera Corp., Lu135M) を用いてサンプルを狙う。励起光はフェムト秒パルスレーザーである。レーザービームは集光レンズを使用せずに直接サンプルに照射し、試料ステージの法線に対する入射角は 60° である。試料からの SHG 散乱光を対物レンズで結像し、II-CCD カメラ (HAMAMATSU, PMA-100) で検出する。バンドパスフィルターで観察したい波長を選択する。干渉によるゴーストを除去するため、短波長パスフィルターとバンドパスフィルターを平行光の波面に対して 5° の傾斜角で配置した。M1, M2: Mirror. ND filter: Neutral density filter. L.P.F.: Longwavelength pass filter. S.P.F.: Shortwavelength pass filter. B.P.F.: Bandpass filter.

米の SHG を観察する実験装置は図 6.2 に示すように、3.2.1 節の図 3.22 のものを改造したものである。その唯一の違いは集光レンズの有無である。米を観察する際

に広い視野の画像をとることが望ましいので、より広い励起照射面積を得た。光源は、繰り返し周波数 1 kHz、パルス時間幅約 120 fs、中心波長 800 nm の再生増幅器で増幅したチタンサファイアフェムト秒パルスレーザであった。集光レンズは使用せずにビームを試料に直接照射したので、照射面積はおよそ 170 mm² である。観察する際に、CMOS カメラを用いてフォーカスを合わせ、試料表面を視野の中心に移動させ、モニターした。そして、散乱された SHG 光信号を OLYMPUS BX60 顕微鏡光学系で結像してから、II-CCD カメラで撮影した。サンプル表面上の励起光のパワーは、ND フィルタによってコントロールした。サンプルの前にロングパスフィルター (L.P.F.) を挿入し、780 nm より短い波長の光を遮断し、波長 800 nm のビームを通過させた。試料からの散乱 SHG 光は対物レンズ (対物レンズの倍率は $\times 5$, NA = 0.15) を通過して平行光線となり、波長範囲 350~785 nm のショートパスフィルター (S.P.F.) を通過した。このショートパスフィルターで波長 800 nm の光を遮断した。最後に、SHG 信号を中心波長 400 nm の Semrock 製の FF01-395/11 バンドパスフィルター (B.P.F.) で選択し、2 光子励起蛍光 (2PEF) を中心波長 438 nm の Semrock 製の FF02-438/24 バンドパスフィルターで選択した。対物レンズの倍率が $\times 5$ のときの空間分解能は 2.6 μm である。SHG 及び 2PEF のイメージにおいて、励起パワーは 60.3 mW で、積算時間は 1 分であった。線形の顕微像は、白色光照明を用いて CMOS カメラによって取った。SHG (400 nm 波長) と 2PEF 散乱強度分布を 800 nm 光で励起し、II-CCD カメラで撮像した。

6.3 米種子における SHG の観察結果

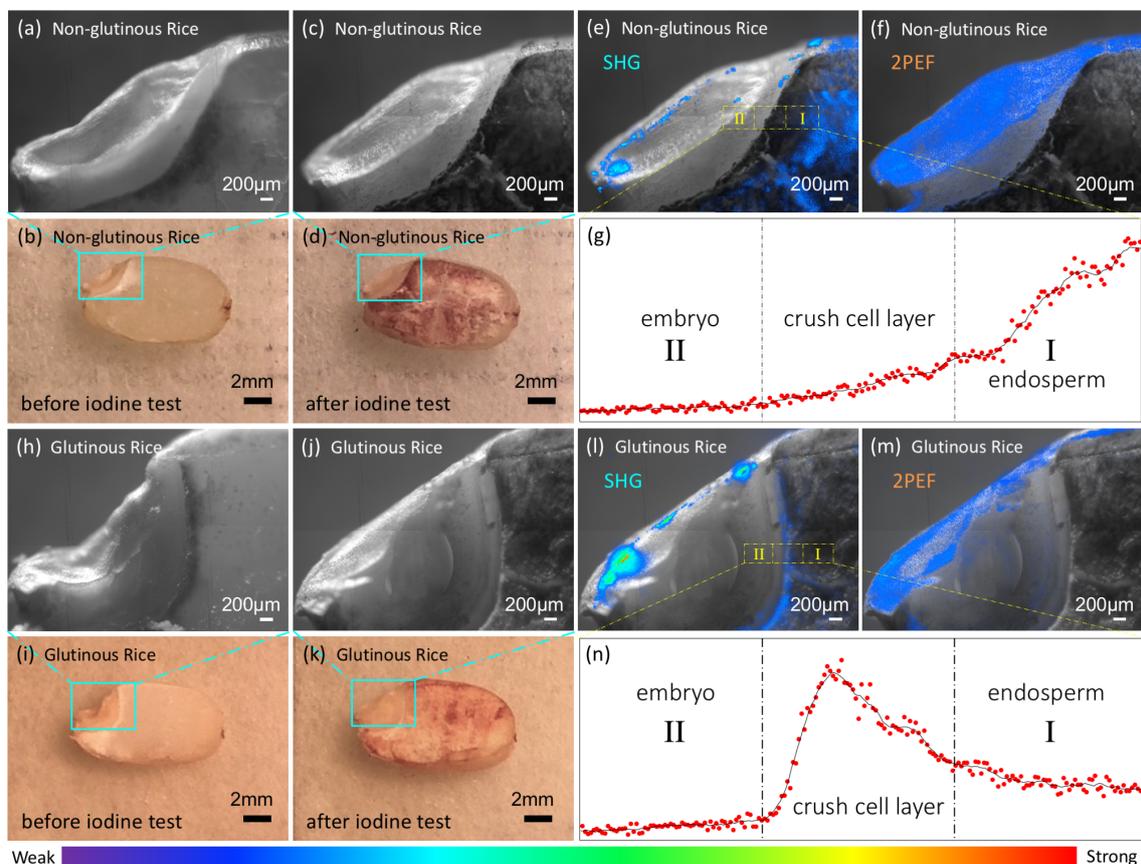


Fig. 6.3 (a-g) は非発芽うるち米 (*Oryza glaberrima* cv. Koshihikari) 種子。(a) 断面の顕微鏡像。(b) 断面の写真。(c) 5 分間のヨウ素デンプン呈色反応後の顕微鏡像。(d) (c) に対応する写真。(e) SHG 画像。(f) 2PEF 画像。(g) (e) の黄色フレーム内における SHG 強度分布。(h-n) は非発芽もち米 (*Oryza glaberrima* cv. Shintaishomochi) 種子。(h) 断面の顕微鏡像。(i) 断面の写真。(j) 1 時間のヨウ素デンプン呈色反応後の顕微鏡像。(k) (j) に対応する写真。(l) SHG 画像。(m) 2PEF 画像。(n) (l) の黄色フレーム内における SHG 強度分布。すべての線形像は白色光照明によるものである。また、(e) と (l) の SHG と (f) と (m) の 2PEF 画像において、ノイズレベルの強度値を透明化処理し、信号の強度値によって下のバーに示す擬似色をつけ、それに対応する線形像の上に重ねて表示したものである。(b)(d)(i)(k) の写真中のシアン色枠ボックスの領域は、顕微鏡画像の視野に対応する。(g) と (n) の SHG 強度は各プロットに対応する縦列ピクセルの強度値の合計である。

まず、未発芽の玄米の種子断面を観察した。図 6.3(a-f) は未発芽のうるち米 (*Oryza glaberrima* cv. Koshihikari)、図 6.3(h-m) は未発芽のもち米 (*Oryza glaberrima* cv. Shintaishomochi) の二種類の米にけるヨウ素デンプン呈色反応前後の様子(図 6.3(b,d,i,k))、およびそれぞれの SHG (図 6.3(e,l)) と 2 光子励起発光 (2PEF) 像 (図 6.3(f,m)) で

ある。もち米における呈色反応はうるち米より呈色がでにくく、iodine 試薬におよそ 1 時間で浸漬した後に撮影したが、その時には胚の部分が膨張していた (図 6.3(h,i,j,k))。うるち米ともち米の胚乳はいずれも呈色した。そして、それぞれの胚乳からは SHG が観測された (図 6.3(e) and 図 6.3(l))。また、SHG 信号は胚乳からだけではなく、胚の糠側からも観察された未発芽のうるち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Koshihikari) と未発芽のもち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Shintaishomochi) のいずれも、胚の糠側に沿って非常に強い SHG 信号が観察された (図 6.3(e) and (l))。一方胚乳からの 2PEF 信号がほとんどなかった (図 6.3(f) と図 6.3(m))。

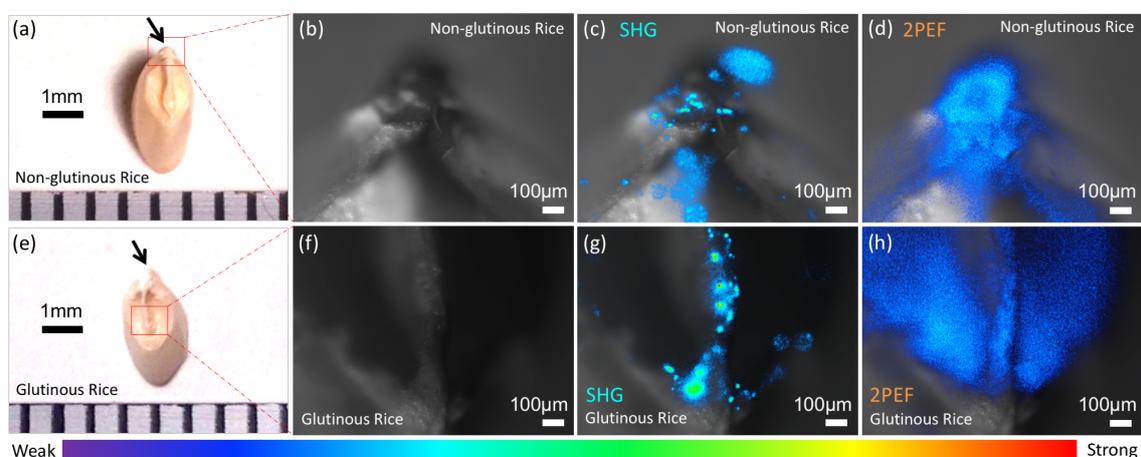


Fig. 6.4 (a-d) は非発芽うるち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Koshihikari)。 (a) 胚側から撮った写真。 (b) 線形の顕微鏡像。 (c)SHG 像。 (d)2PEF 画像。 (e-h) は非発芽もち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Shintaishomochi)。 (e) 胚側から撮った写真。 (f) 線形の顕微鏡像。 (g)SHG 画像。 (h)2PEF 画像である。すべての線形像は白色光照明によるものである。また、SHG と 2PEF 画像において、ノイズレベルの強度値を透明化処理し、信号の強度値によって下のバーに示す擬似色をつけ、それに対応する線形像の上に重ねて表示したものである。

胚の糠側に沿った非常に強い SHG 信号を調べるために、図 6.4 のように胚の糠側の外壁を観察した。胚の糠側では、非発芽うるち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Koshihikari) と未発芽のもち米 (*Oryzaglutinosa* cv. Shintaishomochi) のいずれにおいても、SHG シグナルが確認された。胚軸に沿って非常に強い粒子状の SHG スポットが観察された (図 6.4(c) と図 6.4(g))。2PEF 信号 (図 6.3(d, h)) は SHG とは全く別の分布で観察された。一方、胚乳部分の外壁を調べた結果、非常に強度が弱い SHG が発生する箇所が観察されたが、2PEF は観察されなかった (図を省略した)。

その強い SHG スポットの起源を確認するために、胚に存在する SHG の発生があり得る物質の SHG 活性を調べた。3つの物質すなわち α -アミラーゼ、グルコース

結晶、マルトース結晶における SHG 活性を SHG 顕微鏡で確認した。その結果、表 6.1 に示す二つとも SHG が発生した。

Table 6.1 三種の試薬における SHG

Sample	α -amylase 試薬	グルコース結晶	マルトース結晶
SHG	Active	Active	Active

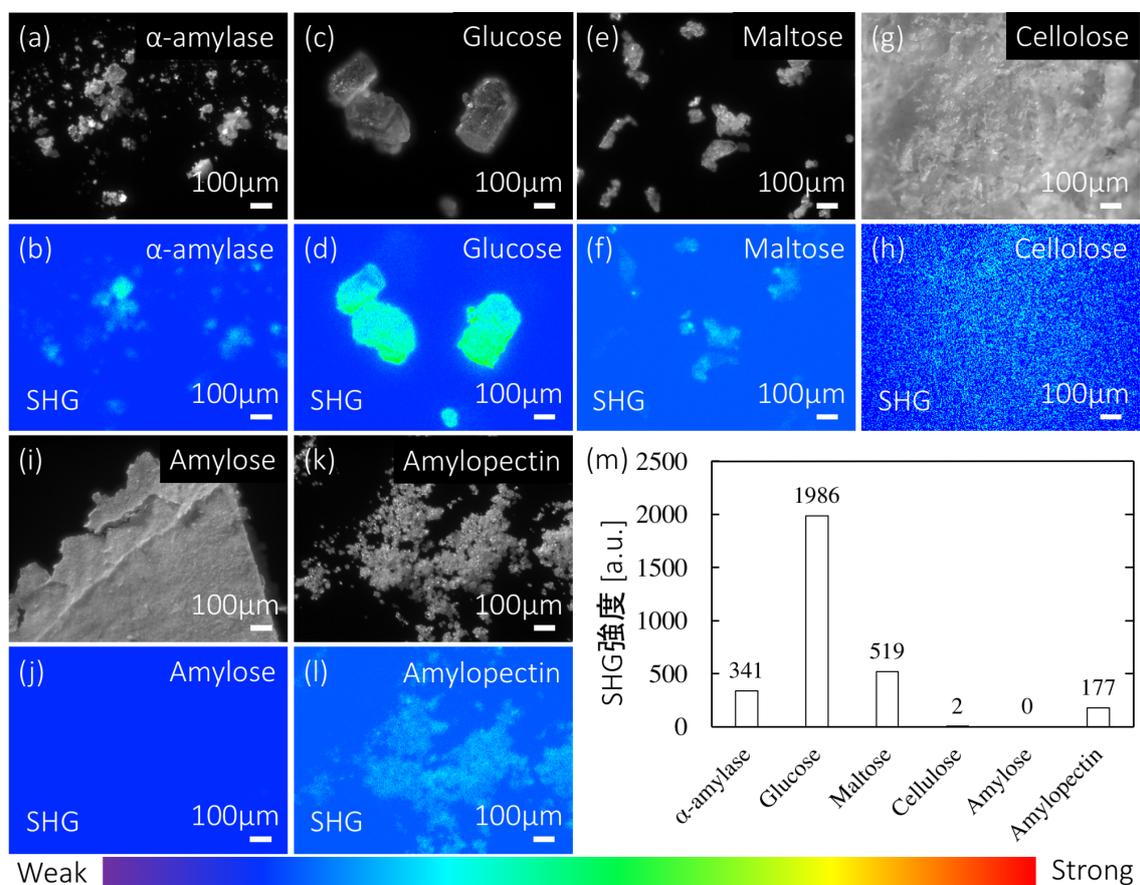


Fig. 6.5 各試薬における線形図と SHG 図。(a) α -アミラーゼ試薬の線形図。(b) α -アミラーゼ試薬の SHG 図。(c) グルコース結晶の線形図。(d) グルコース結晶の SHG 図。(e) マルトース結晶の線形図。(f) マルトース結晶の SHG 図。(g) セロロース試薬の線形図。(h) セロロース試薬の SHG 図。(i) アミロース試薬の線形図。(j) アミロース試薬の SHG 図。(k) アミロペクチン試薬の線形図。(l) アミロペクチン試薬の SHG 図。(m) 各試薬における SHG 強度のグラフ。

Table 6.2 各溶媒で洗った“剥離物”における SHG

Bran	No-washing	Water Washed	Ethanol Washed	DMF Washed
SHG	Detected	Not detected	Detected	Not detected

さらに糠の SHG を調べた。糠の作り方は市販の精米機で 7 分づきで加工した。7 分づきとは、玄米から糠と胚の一部を剥がす精米加工である。その剥がれたもの（以下、“剥離物”と呼ぶ）が胚を含む糠である。まず、糠ではヨウ素デンプン呈色反応でデンプンがないことを確認した。次に、SHG 顕微鏡で SHG が発生することを確認した。そして、精米加工で剥がれた粉状の糠を水、エタノール、N,N-dimethylformamide (DMF) 三つの溶媒に入れ、十分にかき混ぜてから、濾紙で回収した。回収したものを乾燥し、それぞれを SHG 顕微鏡で観察した結果は表 6.2 に示している。エタノールで洗ったものだけ SHG が発生し、水と DMF で洗ったものは SHG が発生しなかった。“剥離物”における SHG の起源を確認するため、水、エタノール、N,N-dimethylformamide (DMF) の三つの溶媒で“剥離物”を洗う比較実験をしたのが表 6.2 にまとめ、三つの可能性があるものそれぞれの溶媒における溶解性は表 6.3 に示す。

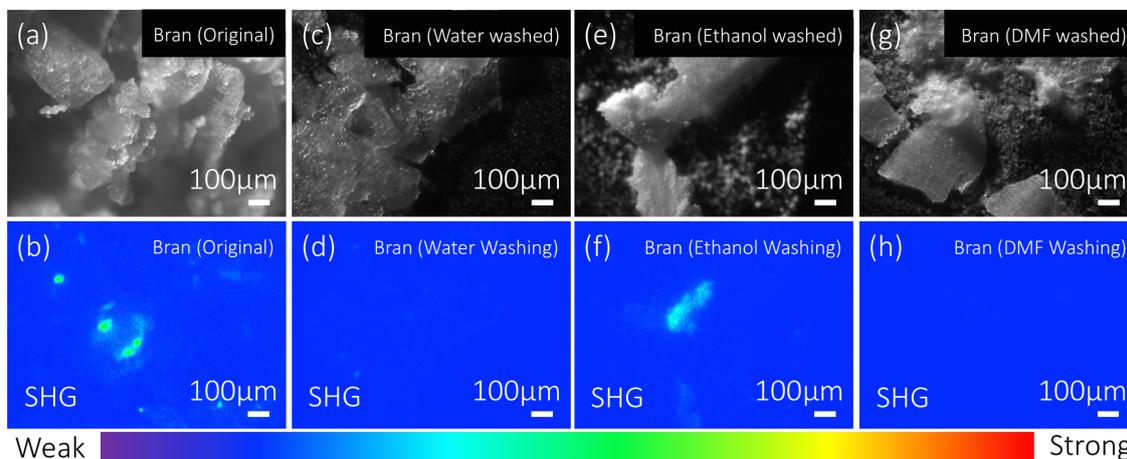


Fig. 6.6 もち米 (*Oryza glaberrima* cv. Shintaishomochi) を精米機で 7 分づき糠 (糠と胚の一部を含んでいる「以下、“剥離物”と呼ぶ」)。各溶媒で洗浄したあとの“剥離物”における線形図と SHG 図。(a) オリジナルな 7 分づき糠の線形図。(b) オリジナルな 7 分づき糠の SHG 図。(c) 水で洗った後の線形図。(d) 水で洗った後の SHG 図。(e) エタノールで洗った後の線形図。(f) エタノールで洗った後の SHG 図。(g) N,N-dimethylformamide (DMF) で洗った後の線形図。(h) N,N-dimethylformamide (DMF) で洗った後の SHG 図。

Table 6.3 三つの候補は三種の溶媒における溶解性

	Water	Ethanol	DMF
(i) α -amylase	Soluble	Insoluble	Insoluble
(ii) Glucose, Maltose	Soluble	Insoluble	Soluble
(iii) Leukoplasts	Insoluble	Unknow	Unknow
Residue	(iii)	(i), (ii), (iii)	(i), (iii)
SHG of Residue	No	Yes	No

6.4 米種子における SHG の考察

過去の研究で、もち米種子の断面における胚乳と胚の間の粉碎細胞層付近は赤外光の波数 2920 cm^{-1} と 2970 cm^{-1} における SFG シグナルの増強が観察された [79]。この波数に対応する周波数は、アミロペクチン分子の C-H 伸縮振動の共鳴周波数である。本研究では同じ種類のもち米における胚乳と胚との間の粉碎細胞層から同じような SHG 強度の増強 (図 6.3(l,n)) を確認し、さらにその強度分布も過去の研究 [79] に示した SFG 強度分布に一致した。このことより、もち米の粉碎細胞層における SFG の増強効果 [79] は化学種の違いではなく、中心対称性の破れの空間的变化であったことがわかる。その二次の非線形効果の増強は、粉碎細胞層付近のアミロペクチンの密度が高いか、高度に配向したかが考えられる。

一方、うるち米ともち米の構成成分を見ると、もち米におけるデンプンはアミロペクチンだけで構成されているが、うるち米におけるデンプンはアミロペクチンだけではなくアミロースも含まれている。また、うるち米の粉碎細胞層付近においてヨウ素デンプン呈色反応に呈色した (図 6.3(c,d)) が、アミロースは二次の非線形光学効果が非常に弱いことが知られている [77]。今回の観察では、うるち米の粉碎細胞層付近に SHG が観察されなかった (図 6.3(e,g))。これらのことより、うるち米の粉碎細胞層付近の胚乳は主にアミロースから構成されると推測される。これらの結果により、粉碎細胞層付近におけるデンプンの種類と分布は米の種類によって異

なることがわかった。

本研究は、実際にフーリエ変換赤外分光分析 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) で米種子断面を測定したが、全く分子の種類を判別できなかった。米種子は、デンプン、セルロース、油脂などを含む。赤外分光の吸収スペクトルをみると、デンプンのような多糖類のもつ分子結合は種類によらずほぼ同じスペクトルを示す。よって、赤外分光法を用いて混合物内でのデンプンなどの判別は不可能である。指紋領域では、単糖や二糖は判別できるが、デンプンのような多糖類は判別できない。

米種子は発芽するとき水分を吸収し、水は図 6.4(a) と (e) の黒い矢印で示される胚と胚乳の境界を覆う種皮を通過し、粉碎細胞層に到達する。次いで、水は胚盤の吸収細胞層を通過し、胚組織に移動する [80]。一方、胚自身にはデンプンが存在せず、発芽の初期段階において、デンプンではなくグルコースやスクロースを消費する [80, 81]。

次に、胚における SHG スポットの起源として、以下の 3 つの候補を提案する。候補 (i) α -アミラーゼ。アミラーゼは発芽していないイネ種子のアリューロン層に貯蔵されている [82]。アリューロン層は米の外皮の下にある 1~4 層の細胞であり、胚乳の一部であるが、精米加工すると糠になる。 α -アミラーゼは、中心対称性が破れているグループ空間 $P2_12_12_1$ の単結晶 [83] であるので、入射光電界に二次の非線形応答をすると考えられる。また、 α -アミラーゼから SHG が発生することを確認した。(ii) グルコースやマルトースの結晶。未発芽の種子の胚にグルコースやマルトースが存在している [80, 81]。過去の研究ではグルコース結晶粉末から SFG シグナルが検出され、二次非線形応答を示すことが報告されている [69]。また、グルコースとマルトース結晶粉末からも SHG が発生することを確認した。(iii) 白色体 (Leukoplasts)。白色体はアミロプラスト (Amyloplast)、エライオプラスト (Elaioplast) とプロテイノプラスト (Proteinoplast) の総称である [84]。アミロプラストはデンプン粒を含む細胞小器官で、植物の根細胞に一般的に含まれているため [85]、種子の胚軸および莖にも含まれ、そのデンプン粒から SHG 光を発生すると考えられる。エライオプラストは、脂質を貯蔵する細胞小器官である。脂質は高次の光非線形活性をもつ物質である [84]。プロテイノプラストは植物細胞のみ、特に根と種子に見られる細胞小器官であり、タンパク質の結晶を含む [86, 87]。タン

パク質結晶では、タンパク質分子は非中心対称の構造をとり、配向して、二次非線形応答を示す可能性がある [88]。その3つの候補を確認するため、水、エタノール、N,N-dimethylformamide (DMF) の三つの溶媒で“剥離物”を洗う比較実験をしたのが表 6.2 の結果である。三つの候補それぞれの溶媒における溶解性は表 6.3 に示した。

まず、“剥離物”を水で洗い、そこに残ったものは表 6.3 の (i)-(iii) の中では、(iii) 白色体だけと判断した。一方、水で洗った“剥離物”からは SHG が出なかったため、胚における SHG (図 6.3(e,l) の胚の外端部, 図 6.4(c,g)) の起源から候補 (iii) を排除できる。次に、“剥離物”を DMF で洗った後は表 6.3 よりそこに残ったものは、(i) α -アミラーゼと考えられるが、DMF で洗った“剥離物”からは SHG が出なかったため、候補 (i) も排除できる。DMF における白色体の溶解性は不明であるが、白色体の可能性はすでに排除した。従って、残った候補 (ii) のグルコースやマルトースが胚における SHG の原因だと考えられる。このグルコースやマルトースはエネルギーが必要な胚軸に移動する可能性がある。実際に、完熟期に種子が水をかぶると穂発芽するので、完熟種子でも、この過程が多少は起きている可能性が大きいと考えている。なお、 α -アミラーゼの試薬から SHG は発生するが、DMF で洗った後は α -アミラーゼが残るのに SHG 信号が確認されなかった原因は、米種子に存在する α -アミラーゼの量が SHG 観察で使用した α -アミラーゼ試薬と比べて極めて微量であったからと考えている。

第7章 蜘蛛の糸のSHG顕微鏡観察

本研究で開発されたSHG顕微鏡は高分子ポリマーにおける異方的な分子配向を効率よく検出できる。ここで、その実用性を多糖類である天然抽出物質のサクランや米種子の観察から、タンパク質である天然の蜘蛛の糸の観察へと展開する。

蜘蛛の糸は高靱性、高強度という性質をもち、魅力的な材料として研究されている。今までに、蜘蛛の糸における多くの不思議な分子構造やメカニズムが発見された。また、多く研究者やメーカーがバイオテクノロジーを利用して人工の蜘蛛の糸を作り出すことが試みている。一方、研究者が直面する問題の一つは、蜘蛛の糸における高強度の理由がまだよく理解されていないことである。その原因の一つは、シンプルで、短時間で、効果的かつ直接的な観測と解析手法がないということである。SHG顕微鏡を用いれば、核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance, NMR)、X線回折 (X-ray diffraction, XRD) などの解析手法のようにサンプルを試料ホルターに詰めたり、溶解したり、封装したりすることが一切不要で、サンプルに対する制限がなくなる。しかし、今まで蜘蛛の糸のSHGの観察は一切なされてこなかった。そこで、本研究では蜘蛛の糸のSHG顕微鏡観察を試みた。

7.1 蜘蛛の巣および蜘蛛の牽引糸

天然の蜘蛛の糸の主成分はフィブロインというタンパク質である。特に牽引糸 (drag line) は新材料として注目され [89]、優れた力学特性をもっている [90, 91, 92, 93, 94, 95, 96]。例えば、牽引糸の強度はKevlar (Poly-paraphenylene terephthalamide, 強度が同じ重さの鋼鉄よりも高い) に匹敵し、牽引糸を切るのに要するエネルギーもKevlarなどの材料より大きい [90, 91]。異なる種類の糸の強度と靱性も大きく異なって、横糸の伸長は縦糸の40倍もある [90, 91]。円網を張る蜘蛛は Tab. 7.1 に示すように7種類の分泌腺からフィブロインなどを分泌し、用途によって7種類の性質が異なる糸を作る。

牽引糸 (drag line) は蜘蛛が命を守るための糸として巣を構成する骨格として最も重要であり、強度と延長度が良い糸である。蜘蛛の牽引糸 (drag line) を構成するフィブロイン分子の構造は、アミノ酸が非常に規則正しく並んだ β -シート構造 [111, 113] で、そこでは微小な結晶ブロック [114, 96, 115, 116] と、不規則な部分が交互に現れる [117, 118]。

図 7.1 に示すように、らせん構造で構成された非結晶領域は外力を加えるとばねのように引き伸ばされ、牽引糸 (drag line) に弾性的な特性を与え [103, 119]、 β -シート構造は糸に高強度の特性を与える [93, 115, 120, 121, 103, 122]。タンパク質の β -シートは SHG 活性をもつことが知られている [123]。高度に配向した β -シート構造を含む天然のカイコのシルク繊維からは SHG が発生する、また、ヘキサフルオロ-2-プロパノールシルクフィブロイン (hexafluoro-2-propanol silk fibroin、カイコのシルクから抽出された) 溶液でできたキャスト膜からは SHG が発生しないが、外力で膜を引っ張って β -シート構造を強制的に配向させたあと SHG が発生するようになった [124] ことが報告されている。

蜘蛛の大瓶状腺 (Large ampullate gland) は異なる分泌粒を持っていて、ある分泌粒は六角柱状の液晶を分泌する [117]。この液晶の生成にあたっては、まず、大瓶状腺内で、数ナノメートルの β -シート結晶が自己組織化で数十ナノメートルのミセル (micelles) を形成し、さらに、液晶構造を呈し、最後に、より安定した β -シート構造になる [125]。タンパク質は蜘蛛の分泌腺のダクト内では酸性浴の中で高濃度の液晶状態になっており [126]、複屈折性がない [127]。タンパク質分子が長軸方向に平行に並ぶ構造が維持されているところもあり、細いダクトを通過する際に、機械的な摩擦力により分子は並び、繊維軸にそって部分的な秩序化が起こり [117, 90, 125]、複屈折性を呈する [127]。

一方、過去の研究における X 線回折 [114, 128, 129, 130] や核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance, NMR) [111, 113, 131, 128, 132] による解析では、蜘蛛の糸における β -シートが繊維軸にほぼ平行に配向している [105, 90, 131] という報告があった。しかし、 β -シートは糸において、どういうふうに、どんな形で配向しているかはまだ解明されていない。特に、ミクロな構造における場所依存性は X 線回折や NMR では得ることができない。

一方、二次の非線形光学効果は配向した構造に敏感なので、効率よく高度に配向

した構造を検出することができる [133, 5]。しかし、蜘蛛の糸における二次の非線形光学性質に関してはまだ報告がない。本研究は、蜘蛛の糸における二次の非線形光学効果を本研究で開発した SHG 顕微鏡を用いて観察した。そして、SHG 顕微像の観察結果に基づき、 β -シート における入射光偏光依存性から、 β -シートでできた結晶領域の非線形光学効果を分析した。

7.2 サンプルの採取と観察方法

生きているコガネグモ科 (*Araneidae*) オニグモ属のオニグモ (*Araneus ventricosus*) (図 7.2(a)) を強制的に巻き取った牽引糸とそれが張った円網をサンプルにした。牽引糸を採取するとき、蜘蛛をアルミ製の枠に乗せてから、軽く地面に投げようとする力を与えた。蜘蛛は慣性で地面に落ちるが、牽引糸を出してアルミ枠から下っていた。このとき、牽引糸が切れて蜘蛛が地面に落下しないように、枠を回転しながら牽引糸を巻いて採取した。また、野外にはっている巣を取るときは、蜘蛛を追い払ってから、巣をそのまま銅のリングでとった (図 7.2(b))。

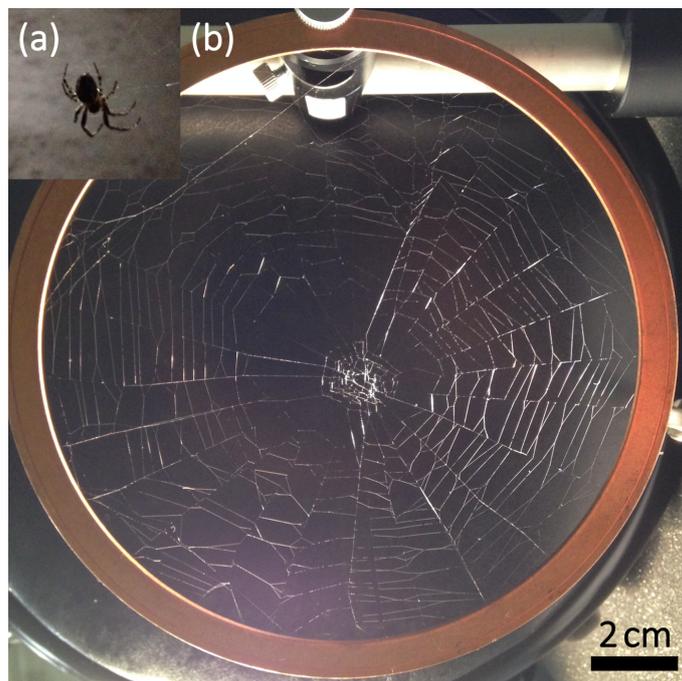


Fig. 7.2 (a) コガネグモ科 (*Araneidae*) オニグモ属のオニグモ (*Araneus ventricosus*) の写真。(b) オニグモ (*Araneus ventricosus*) の円網とサンプルホルター。 Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

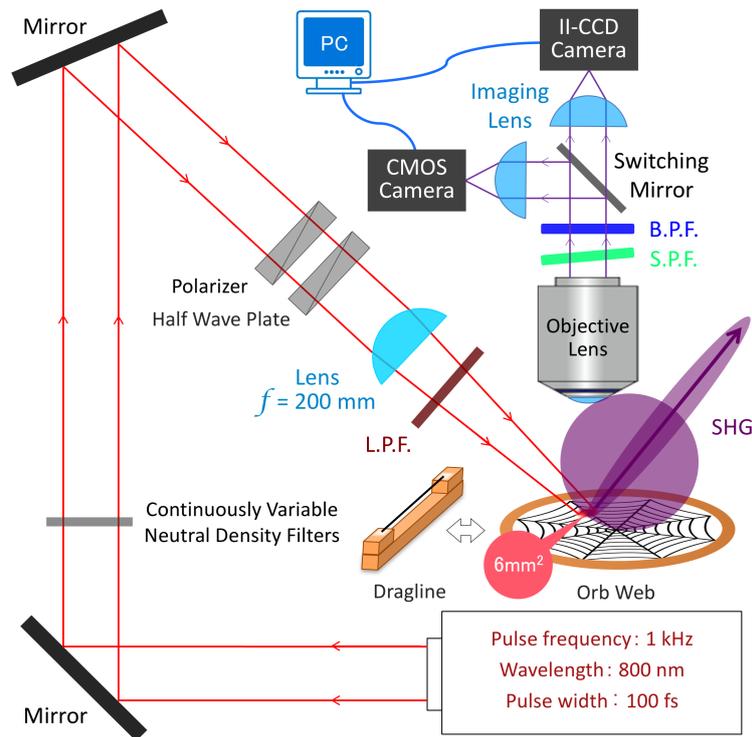


Fig. 7.3 SHG 顕微鏡システムのセットアップ。観察する際に、CMOS カメラ (Lumenera Corp., Lu135M) を用いてフォーカスを合わせ、試料表面を視野の中心に移動させ、モニターした。光源はフェムト秒パルスレーザーである。レーザービームは試料に集光され、試料台の法線に対して、入射角は 60° にした。サンプルにけるビームの照射面積は約 6 mm^2 である。試料から SHG 散乱光を対物レンズで結像し、II-CCD (image intensified charge coupled device) カメラ (HAMAMATSU, PMA-100) によって検出した。400 nm のバンドパスフィルターを 438 nm に置き換えると、2PEF 画像を観察できる。干渉による”ゴースト”信号を除去するために、平行光線に対して短波長パスフィルターを 5° の角度で配置した。L.P.F. : 長波長フィルター。S.P.F. : 短波長パスフィルター。B.P.F. : バンドパスフィルター。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

試料の配置は Fig. 7.3 のとおりである。蜘蛛の巣を観察するときは、そのまま銅のリングをステージに乗せた。牽引糸の場合は、木製のホルダーに両面テープで牽引糸の両端を固定した。光源は再生増幅したチタンサファイヤレーザーで、繰り返し周波数 1 kHz, パルス幅約 100 fs, 波長 800 nm の光パルス列を発する。試料位置におけるパワーは ND (neutral density) フィルターでコントロールした。焦点距離が 200 mm のレンズでビームをサンプルに集光する。レンズの次に 780 nm 以下の波長をカットするロングパスフィルター (L.P.F.) を置いた。集光レンズの焦点距離は 200 mm であるが、照射面積を約 6 mm^2 とするために、195 mm のところに試料をセットした。市販の顕微鏡 OLYMPUS BX60 を用いて、試料から発生した

SHG 散乱光を対物レンズ通して無限遠補正光学系で平行光線にした。対物レンズの次にバンドパスフィルター (B.P.F.) (Semrock: FF01-395/11) で SHG 光を選択した。また、SHG と近い波長領域で発生する二光子励起発光 (2-Photon Excitation Fluorescence, 2PEF) を観測するために中心波長 438 nm のバンドパスフィルター (Semrock: FF02-438/24) を用いた。白色光照明におけるリアルタイムの顕微像は、CMOS カメラ (Manufacturer : Lumenera corporation, model number : Lu135M) で撮像した。SHG 強度の検出には Image Intensified - Charge Coupled Device (II-CCD) カメラ (Manufacturer : HAMAMATSU, model number : PMA-100) のフォトンカウンティング (photon counting) 機能を用いて撮像し、各ピクセルから強度値をとった。集光レンズを透過する前に、偏光子 (polarizer) で入射光の偏光として直線偏光成分のみを選んだ。サンプルにおける偏光の角度は 1/2 波長板 (half wave plate) で変えた。

7.3 蜘蛛の糸の SHG 顕微鏡観察

7.3.1 蜘蛛の巣の SHG 顕微鏡観察

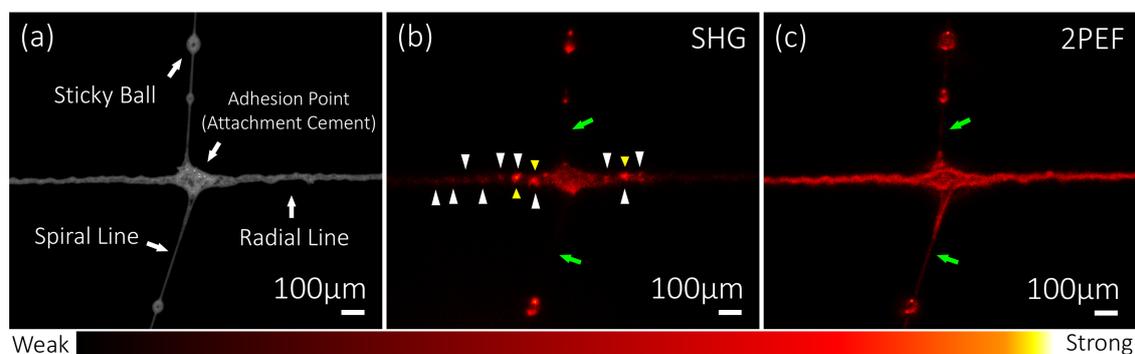


Fig. 7.4 (a) 白色光照明で CMOS カメラで撮影した蜘蛛の巣の顕微像。縦糸 (radial line)、横糸 (spiral line) (横糸に粘球 (stichy ball) が付いている) と二つの糸の接着点が見える。(b) 対応する SHG 像と (c) 2PEF 像である。(b) と (c) は波長 800 nm の励起で、それぞれ 400 nm と 438 nm のバンドパスフィルターで選択した。対物レンズは 5 倍で、NA = 0.15。励起光パワーは 80 mW、照射面積 6 mm² で、SHG と 2PEF における積算時間はそれぞれ 300 s と 50 s である。2PEF 用のバンドパスフィルターの透過波長幅は SHG 用の 6 倍のため、積算時間は 1/6 にした。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

図 7.4(a) は顕微鏡に取り付けた CMOS カメラで撮った白色光照明による orb web の一部の光学顕微像である。図 7.4(b) は、波長 400 nm のバンドパスフィルターを対物レンズの後に挿入して顕微鏡に取り付けた II-CCD カメラで観察した強度像である。図 7.4(c) は、バンドパスフィルターを波長 438 nm のものに替えて観察した強度像である。もし、図 7.4(b) と (c) における信号が、スペクトル幅の広い同じ起因（スーパーコンティニウム光やバックグラウンド）によるものなら、波長 400 nm においても、438 nm においても同じような画像がとれるはずである。しかし、図 7.4(b) と (c) において、信号が発生する場所は違う。すなわち、図 7.4(b) において、小瓶状腺（small ampullate gland）から分泌された縦糸の数十マイクロメートルの強いスポット（図 7.4(b) の黄色矢印）と周期的に増強した信号（図 7.4(b) の白色矢印）が観察され、これは SHG と判断される。一方、鞭毛腺（flagelliform gland）から分泌された横糸からは 438 nm の 2PEF 信号は見える（図 7.4(c)）が、400 nm の信号はほとんど観察されなかった（図 7.4(b) の緑色矢印）。従って、以上により蜘蛛の巣の縦糸の SHG 信号および SHG 像が初めて観察された。横糸に付いている粘球からの強い信号は、(b) と (c) においていずれも検出され、発光であると考えられる。ここでわかりやすさのために図 7.4(c) を 2PEF と表記する。

7.3.2 蜘蛛の牽引糸の SHG 顕微鏡観察

肉眼で一本に見える牽引糸は一对の糸疣から分泌されるので、光学顕微鏡で観察すると二本に見える（図 7.5）。図 7.5(a) の白色光照明顕微像は上下の二本が平行で、(b) はねじれていることがわかる。この牽引糸からも初めて SHG が観測された。この SHG 信号の入射光偏光依存性を調べた結果を図 7.6 と図 7.7 に示す。図 7.6 で 400 nm の SHG 信号の入射光偏光依存性を調べるとき、図 7.5(a) のようなねじれない試料を対象として観察した。牽引糸からの波長 438 nm の 2PEF 信号は弱く、画像はとれなかったので、図 7.6 で観察されるシグナルはすべて SHG である。観察側は偏光は選んでいない。

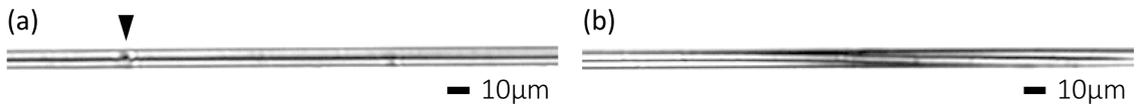


Fig. 7.5 COMS カメラで撮られた白色光照明における二組の牽引糸の透過光明視野光学顕微像。肉眼で一本に見える糸は実はペアとなる糸束から分泌され、顕微鏡観察において二本に見える。(a) 上下に平行な二本。(b) ねじれている二本。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

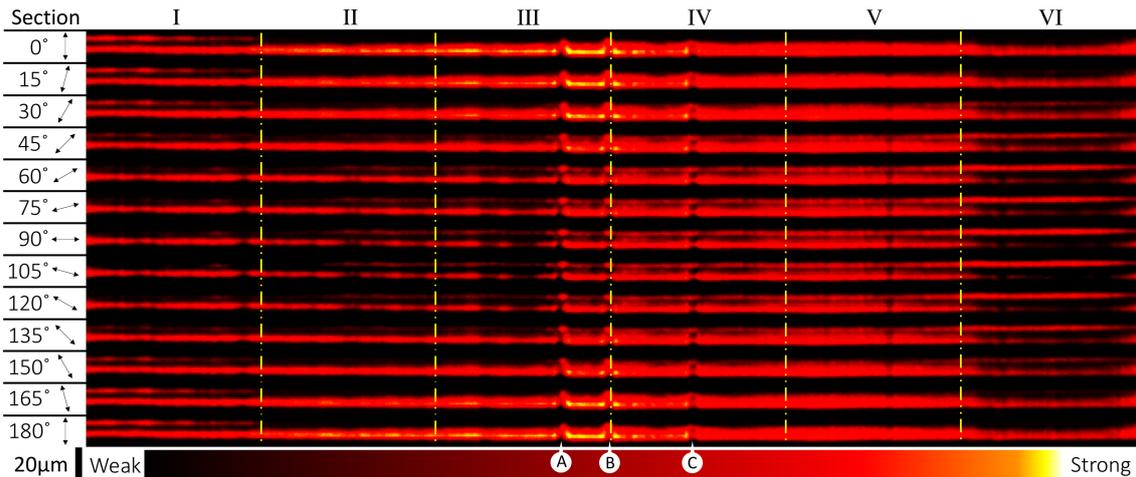


Fig. 7.6 牽引糸における SHG 像の入射光偏光依存性。励起光パワーは 80 mW, 照射面積 6 mm² で、400 nm のバンドパスフィルターで SHG を選択した。対物レンズは 20 倍で、NA = 0.46。入射光の偏光は 1/2 波長板で時計回りで 15° ずつまわした。II-CCD カメラで各偏光角度における SHG 像をとった。観察側は偏光は選んでいない。入射光の偏光は繊維軸と垂直な方向は 0° と定義した。SHG 顕微像は偏光の回転の順序 (0°-180°) で、左側に回転角と図表示を示した。また、偏光依存性の場所依存性を分析するために繊維軸方向で 6 つの区間 I-VI に分けた。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

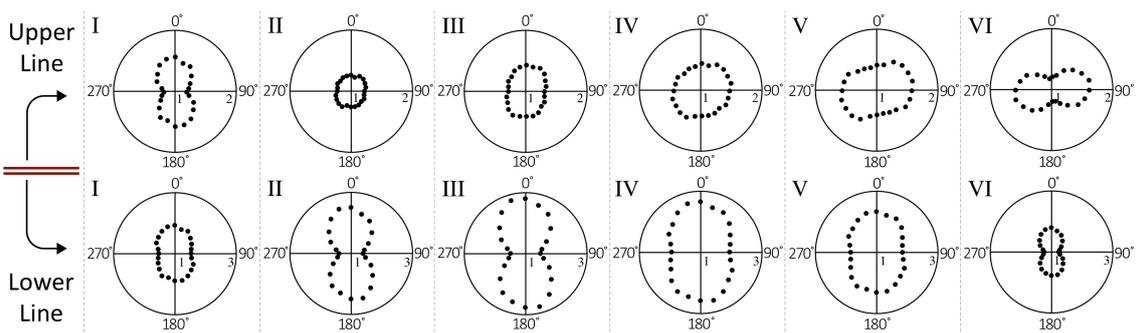


Fig. 7.7 図 7.6 で分けられた区間における SHG 強度の入射光偏光依存性の極グラフ。上段の極グラフは上の一本、下段の極グラフは下の一本の偏光依存性である。0°-180° は実測値で、180°-360° における偏光は 0°-180° と等価なので、0°-180° のコピーである。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

図 7.6 は、入射光の偏光は 1/2 波長板で時計回りで 15° ずつまわして、II-CCD カメラで各偏光角度における牽引糸の SHG 像である。入射光の偏光は繊維軸と垂直な方向は 0° と定義した。SHG 顕微像は偏光の回転の順序 (0°-180°) で、左側に回転角と図表示を示した。また、偏光依存性の場所依存性を分析するために繊維軸方向で 6 つの区間 I-VI に分けた。図 7.6 を見ると、上下の二本の SHG 強度は場所に依存することがわかる。例えば、90° の像に注目する。左の区間 I から右の区間 VI に行くにつれ、上の一本の SHG 像は徐々に現れることがわかる。一方、下の SHG 強度は区間 I から区間 VI に行くにつれ、徐々に強くなって、中央の区間 III と区間 IV において一番強くなり、中央を過ぎてまた徐々に弱くなる。つまり、上下二本の糸において、場所によって、SHG の平均強度が変化する。

次に、入射光偏光の関数で見る。区間 VI を 0° から 180° への順でみると、上の一本の SHG 像は 0° においてほぼ現れていないが、偏光角度を増やしていくと徐々に現れてきて、90° において一番あかるくなる。90° を過ぎてまた徐々に弱くなり、180° で消える。一方、下の一本の SHG 強度は、0° から 180° に行くにつれて、だんだん弱くなり、90° で一番暗くなる。90° を過ぎてまた徐々に強くなり、180° で強くなる。

図 7.7 は、サンプリングした区間 I から区間 VI にわたって、上下二本それぞれにおける SHG 強度の入射光偏光依存性を極グラフで示したものである。まず上段の上の一本については、極グラフのパターンは左の区間 I から右の区間 VI に行くにつれ、パターンがだんだん丸くなって、最後の区間 VI において、ちょうど区間 I を 90° 回転したようになっていることがわかる。次に下段の下の一本については、極グラフのパターンは左の区間 I から右の区間 VI に行くにつれ、区間 III まで上下が伸びていき、区間 IV からまた縮んでいた。一方、区間 IV や区間 V において、横方向が太くなったことがわかる。

また、図 7.6 の区間 III と IV において、数マイクロメートルサイズの SHG スポットが上の一本に観察された。それらの SHG スポットの強度も入射光偏光に依存した。その三つのスポットの SHG 強度における極グラフを図 7.8 に示す。

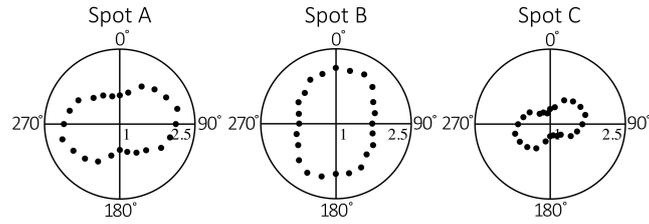


Fig. 7.8 図 7.6 に示した三つの SHG スポット A, B, C における SHG 強度の入射光偏光依存性の極グラフ。0°-180° は実測値で、180°-360° における偏光は 0°-180° と等価なので、0°-180° のコピーである。

7.3.3 蜘蛛の糸における SHG の考察

図 7.4(b) では縦糸におけるスポット状の SHG 像が観察されたが、横糸からは SHG 信号が全く観察されなかった。図 7.6 では、牽引糸全体から SHG が観察された。図 7.1 に示すように、牽引糸、縦糸と横糸における構成成分の唯一の違いはタンパク質の β -シートの有無であり、横糸 (spiral line) にのみ β -シートが含まれない [109]。さらに、7.1 節にも述べたように、高度に配向した β -シート構造を含む天然のカイコのシルク繊維や外力で強制的に β -シート構造を配向させた膜からは SHG が発生する [124]。従って、縦糸 (radial line) や牽引糸 (dragline) の SHG は配向した β -シートが起源であると推測できる。

外力で配向させたシルクフィブロイン (silk-fibroin) β -シート [134] やアミロイド (amyloid) を構成する β -シート [135] は複屈折性をもつことが知られている。その β -シートは蜘蛛の分泌腺の細いダクトを通過する際に配向し、複屈折性をもつ異方性結晶領域を構成する [90, 127, 117] と考えられている。蜘蛛の糸における β -シートが繊維軸にほぼ平行に配向している [90] という報告があった。図 7.1 の構造モジュールのグレーボックスに示したように、牽引糸は縦糸と同じように、MaPs1 と MaPs2 から構成され、 β -シートというモジュールを含んでいる。従って、縦糸 (radial line) や牽引糸 (dragline) における β -シートナノ結晶は配向し、巨視的に非中心対称構造をとって、SHG を誘起したと考えている。蜘蛛から牽引糸を強制採取するとき、牽引糸は蜘蛛の自重によって引っ張られ、また、蜘蛛が巣を張るためにも、糸を引っ張る。従って [124] の結果を考えれば、 β -シートは外力によっても、より高度に配向していたと考えられる。

過去の報告 [90, 105, 131] によれば、 β -シートは蜘蛛の牽引糸の中で図 7.9(a) のよ

うに配向している。蜘蛛の糸における β -シートの非線形感受率 $\chi^{(2)}$ の異方性の情報は過去に報告がないが、今度の入射光偏光依存性の結果をみて、仮に以下のモデルを考える。図7.9(b)に示すように β -シートの試料座標 x, y, z を定義した。ここで、 β -シートにおける非線形感受率 $\chi_{xxx}^{(2)}$ 、 $\chi_{yyy}^{(2)}$ 、 $\chi_{zzz}^{(2)}$ ($\chi_{xxx}^{(2)} \neq \chi_{yyy}^{(2)}$)の三つの成分が0でない値をもつと仮定する。図7.9(a)に示すように、 β -シートは繊維軸にほぼ平行に β -シートが配向しているが、繊維軸と垂直な方向に進む入射光の波面に対して、 β -シートの x 成分が大きくなったり、 y 成分が大きくなったりする。一方、 $\chi_{zzz}^{(2)}$ は β -シートがどの方向を向いても一定である。従って、 $\chi_{xxx}^{(2)}$ と $\chi_{yyy}^{(2)}$ の値が異なれば、 β -シートが回転することによって、繊維軸と直角方向の実質 $\chi^{(2)}$ が変化する。つまり、 $\chi_{xxx}^{(2)}$ 、 $\chi_{yyy}^{(2)}$ 、 $\chi_{zzz}^{(2)}$ の和の効果をとると、偏光依存性のパターンは図7.7のようになる。また、図7.7をみると、SHG強度や偏光依存性は場所にも依存している。その原因は、 β -シート配向の秩序性によるものだと考えている。

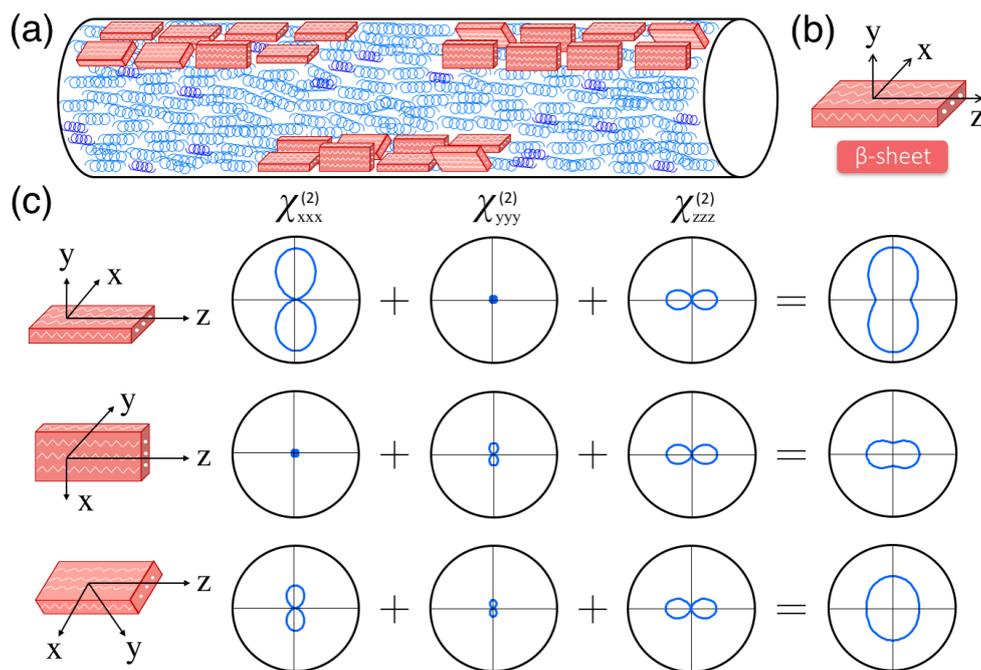


Fig. 7.9 (a) 予想した牽引糸における β -シートの配向。(b) β -シートの試料座標 x, y, z の定義。(c) 予想した β -シートにおける非線形感受率の三つ成分とその和。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

また、図7.6の区間IIIにおいて、スポット状のSHGが観察された。同様に、白色光照明による顕微像にも牽引糸の上にスポット状なものが観察された(図7.5(a)の

黒色矢印)。この牽引糸におけるスポットの起源は以下のように考えている。牽引糸を強制採取したとき、金属の枠で蜘蛛を吊って、ぶら下がらせる状態で枠をロールしながら牽引糸を採取した。ロールするスピードはほぼ一定に保っているが、蜘蛛が一時糸を出すのを停止し、空中に止まることがある。そのとき、糸疣付近で分泌物が一つの塊になり、糸の上にスポット状なものできたと考えている。その牽引糸における SHG スポットの偏光依存性極グラフのパターンは牽引糸全体のパターンと類似するが、糸の長さ方向に関連する異方性をもっていないと考えている。

また、蜘蛛の巣作りを観察すると、図 7.10 に示すように、蜘蛛は巣を作るとき、まず縦糸で骨格を構築し、そのベースの糸に沿って螺旋状に体を進めながら補強する糸を分泌した。第一本目の“base line”は引っ張られている状態に対して、二本目の“reinforcement line”は螺旋状で“base line”のまわりに巻き付いた。ここで、この“reinforcement line”がある角度を向いたときに SHG が最も効率よく発生し、周期的 SHG が増強している（図 7.4(b) の白色矢印）と推測できる。

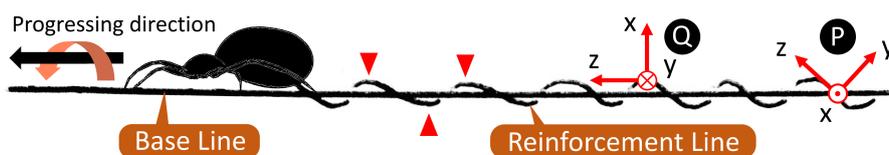


Fig. 7.10 蜘蛛は縦糸を補強するときの様子。縦糸における SHG スポットの箇所 (赤色矢印) と補強用糸における試料座標の変化。“reinforcement line”の接線方向を z 軸と定義すると、P と Q の二箇所において、x, y 軸はちょうど 90° 回転している。Reprinted with permission from ref [112]. Copyright 2017 by the Springer-Verlag GmbH Germany.

また、蜘蛛は縦糸と横糸の接着点において梨状腺から分泌した接着セメント (attachment cement) で接着し固定した。そこからも SHG が出ているようであり、接着セメントによるものと推定する。

最後に、SHG 像と 2PEF 像において、粘球からの強い信号が観察された。その原因は粘球自身の蛍光特性によるものと考えている。

第8章 結論

8.1 総括

非線形光学顕微鏡は、光第二高調波発生や和周波発生を利用して、試料中の標的分子を染色する必要がなく、光退色や細胞毒性副産物が発生するなどの問題も存在せず、高分子から生きている細胞や神経までなどを観察することができるという長所を持っている。本研究では、再生増幅器を用いて、モードロック Ti:Sapphire レーザーからのフェムト秒パルスのピークパワーを 80000 倍に再生増幅して、SHG 顕微鏡の光源として使用した。繰り返し周波数は 1 kHz にしているので、試料には熱がたまらない。したがって、本研究で開発した SHG 顕微鏡システムは短時間、非破壊、非侵襲でサンプルにダメージを与えず、ターゲットにおける分子が配向した部分の全体図を抽出的に観察できるという特長をもっている。

このフェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムを用いて、短時間、低パワーで SHG 顕微像を検出する技術を確立した。従来開発された SHG 顕微鏡では、SHG 顕微像をとるには何時間もかかる。本研究で開発した SHG 顕微鏡システムを用いて、わずか 1 秒間で ZnS 多結晶ペレットの SHG 顕微像をとることができた。また、その励起パワーも 0.14 mW という極めて低い値であった。

また、ほとんどのタンパク質や生体ポリマーにおいて、同じ成分で構成しても、構造と機能が大きく異なる。それに関して定性、定量分析からの知見は得られているものの、光学的顕微観察による解析は未踏の道である。そこで、本研究では、新材料として注目された細胞外マトリックスから抽出した多糖類高分子サクラン、デンプンから構成されている日常生活で食べている米、および高強度の新材料である蜘蛛の糸をサンプルとした。この三つの試料はいずれも生体ポリマーであり、従来の観察手法で観察されなかった特性が本研究で開発した SHG 顕微鏡を用いて観察された。

まず、このフェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡システムを用いて超巨大分子サクランにおける巨視的に反転対称を持たずに配向する部分を SHG 像として観察した。綿状、繊維状および薄膜状の高純度サクランからは、数十 μm の大きさの粒子状の SHG スポットが観察された。また、同じ位置であっても観察の角度を変えると、粒子状の SHG 像の強度も変化したことがわかった。また入射光の偏光に対する像の変化により、この集合体の中でのサクラン分子は異方的な構造をとることがわかった。SHG 顕微像は多層構造を持ち、各層の偏光依存性が異なることからみると、各液晶ドメイン層は各自の配向をもっていると考えられる。一方で、サクランの水溶液を用いて作ったキャスト膜における SHG の発生効率が部位によって異なることがわかった。その原因の候補の 1 つとして成膜するとき水溶液の表面張力によって、水分の蒸発とともに溶液の濃度分布が異なったことが考えられる。SHG スポットの起源は、不純物または大きなサクラン分子、またはサクランカチオンに囲まれたサクランアニオンによる液晶前駆体であると考えられる。同心円電極で作ったサンプルの SHG 観察によって、サクラン分子が負の電極近傍だけにおいて SHG を発生することがわかった。特に、針電極の周囲は電場強度が高く、非常に強い SHG が観察された。このことから、サクラン集合体における SHG の起源はサクランカチオンによるものと判断した。また、負の針電極の周囲における SHG イメージの偏光依存性を観察した結果は、サクラン分子が負の電極の周囲に、針電極の中心を向いて配向したことを強く示唆した。最後に、XPS の結果から、負の針電極に集まったサクランの集合体は硫酸基をもたない成分で主に構成されていると推測した。SHG スポットの起源はサクランカチオンによる構造と結論づけられるが、具体的な構造はまだ明らかではない。

次に、サクランと同じ多糖類であるデンプンに着目した。デンプンの構成単位はサクランより単純であり、グルコースだけである。一方、植物の種子に存在するデンプンは種子の構造や品種によって、異なる二次の非線形光学応答を示すことがあると考えている。本研究では、未発芽のうるち米 (*Oryza glutinosa* cv. Koshihikari) ともち米 (*Oryza glutinosa* cv. Shintaishomochi) からの SHG イメージを観察した。もち米の粉碎細胞層における SHG 信号の増強効果は、過去の研究における SFG の増強効果 [79] と一致し、その原因は分子振動の共鳴ではなく、中心対称性の破れによるものだとわかった。その二次の非線形効果の増強は、粉碎細胞層付近のアミロ

ペクチンの密度が高いか、高度に配向したことにより発生した可能性が考えられる。一方、うるち米の粉碎細胞層付近からは同じような SHG 信号の増強効果は観察されなかった。ヨウ素呈色反応の結果を考慮して、その原因は、うるち米の粉碎細胞層付近で主に SHG が禁制なアミロースが存在する結果と推測している。米種子の粉碎細胞層付近におけるデンプンの種類と分布は米の種類によって異なると考えられる。最後に、デンプンが存在しない胚乳以外の部分、特に胚側に強い SHG スポットが観察された。比較実験によって、グルコースか、マルトースか、あるいはその両方が胚側の糠における強い SHG スポットの起源であると推定した。

本研究で開発された SHG 顕微鏡は高分子ポリマーにおける異方的な分子配向を効率よく検出できる。ここで、その実用性を多糖類である天然抽出物質のサクランや米種子の観察から、タンパク質である天然の蜘蛛の糸の観察へと展開した。非走査型フェムト秒レーザー SHG 顕微鏡を使用して、生きている蜘蛛から採取した糸を観察した。その結果、牽引糸や縦糸からの SHG 信号を検出し、SHG 像を観察することができた。一つの糸疔から出たペアの二本の牽引糸において、普通の光学顕微鏡では区別がつかない、異なる非線形光学性質が現れていることを見いだした。また、肉眼には同じに見える蜘蛛の巣を構成する縦糸と横糸において、異なる非線形光学応答が観察された。縦糸からは SHG が発生したが、横糸からは SHG が発生しなかった。縦糸と横糸におけるタンパク質の β -シートの有無から、SHG の起因は β -シートであると判断した。入射光の偏光に対する SHG 強度の変化により、SHG を誘発する分子は異方的な構造をとることがわかった。また、入射光偏光に対する応答の変化は β -シート自身の並び方による可能性があると考えている。そこで、蜘蛛の糸の巨視的な構造における新しいモデルを提案した。

以上をまとめると、本研究ではフェムト秒パルスレーザーを用いた非線形光学顕微鏡を開発した。その顕微鏡を利用して、サクラン、米種子、蜘蛛の糸といった高分子や生体組織などのポリマーを観察した。このフェムト秒パルスレーザーを用いた SHG 顕微鏡で、サクランにおける特殊な構造を抽出的に検出した。さらに、サクランにおける特殊な SHG の起源を解明した。そして、サクランとの連想により、植物の種子に存在する多糖類であるデンプンに着目し、SHG 顕微鏡を用いて米の断面、胚および胚乳を観察し、いままで観察や判別しにくかった特定な場所を抽出的に画像化した。最後に、異方的な分子配向が SHG 応答をすることから啓発を受け

て、蜘蛛の糸を観察し、蜘蛛の異なる糸から異なる SHG 応答を観測し、それらにおけるマクロな構造の可視化に新たな手段を提供した。本研究で開発した SHG 顕微鏡の可能性をさらに開拓した。以上の三つの試料から観察された SHG 情報に基づいて、各サンプルにおいて、分子が配向した構造を抽出し、可視化の情報を提供した。

8.2 今後の展開と展望

サクランは産業への応用が広範に展望できる新規マテリアルである。一方、サクランの構造はまだ完全に理解されていない。サクランの SHG 像から、大量の構成単位の反転対称性が破れていることがわかったが、その SHG 像の解析は重要な問題である。特に、SHG スポットはサクランカチオンによる構造ということが解明したが、その具体的な構造の解明は今後の課題である。また、サクランにおける金属吸収のメカニズムは未解明である。塩添加によりサクランの自己組織化が促進されれば、塩添加前後の様子を SHG 顕微鏡で観察することで、サクランにおける金属吸収のメカニズムの解明が期待できる。

また、デンプンは言うまでもなく、人類やその家畜ひいては地球上のほぼすべての生物が栄養源とする化合物である。SHG 顕微鏡は、自然界における穀物中のデンプンおよびその構造中の大きな対称性のやぶれに敏感な応答を示す新しい計測法である。デンプンの主成分であるアミロペクチンは、グルコースが連なった糖鎖であるが、その構造が異方性のあるブドウの房構造をしており、この構造が崩れると対称性のやぶれが緩和され、SHG も弱くなる。そのような米の中の糖鎖の観察方法として SHG 顕微鏡は最適である。そのことは SHG 観測がデンプンの検出のみならず、デンプンの品質の評価にもつながることを示している。このように二次的非線形光学を用いた方法は、米の発育のモニターに適している。したがって、米のデンプンにおける非線形光学的性質を利用して、米の品種管理や品質管理への応用が期待できる。

最後、この非走査型フェムト秒レーザー SHG 顕微鏡の観察方法では、サンプルを何も処理せずに直接観察することができる。その観察による結果は非常に直感的である。このシンプルな、短時間で観測できる方法は、蜘蛛の糸などの新材料を研

究するのに効果的かつ直接的な手法を提供できると期待する。例えば、蜘蛛の糸の SHG イメージは蜘蛛の分泌腺内で起こっていることを反映しており、将来、蜘蛛の糸の分泌腺を直接観察することなども含めて、糸を形成するメカニズムを直接観察することができると思われる。そして、人工の蜘蛛の糸を作り出すときの生体模倣技術 (biomimetics) のサポートができると考えている。

参考文献

- [1] P. Franken, A. E. Hill, C. Peters, and G. Weinreich, “Generation of optical harmonics,” *Phys. Rev. Lett.* **7**, 118 (1961).
- [2] N. Bloembergen and P. Pershan, “Light waves at the boundary of nonlinear media,” *Phys. Rev.* **128**, 606 (1962).
- [3] N. Bloembergen, *Nonlinear Optics* (Addison-Wesley World Publishing Co., Inc., Redwood City, California, 1992).
- [4] R. Hellwarth and P. Christensen, “Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe,” *Opt. Commun.* **12**, 318–322 (1974).
- [5] I. Freund and M. Deutsch, “Second-harmonic microscopy of biological tissue,” *Opt. Lett.* **11**, 94–96 (1986).
- [6] S. Fine and W. P. Hansen, “Optical second harmonic generation in biological systems,” *Appl. Opt.* **10**, 2350–2353 (1971).
- [7] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, “Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon,” *Biophys. J.* **50**, 693–712 (1986).
- [8] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, “Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy,” *Opt. Express* **15**, 12286–12295 (2007).

- [9] R. M. Williams, W. R. Zipfel, and W. W. Webb, “Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils,” *Biophys. J.* **88**, 1377–1386 (2005).
- [10] Y. Jinno, K. Shoda, E. Rial-Verde, R. Yuste, M. A., and H. Tsutsui, “Engineering a genetically-encoded SHG chromophore by electrostatic targeting to the membrane,” *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 1–7 (2014).
- [11] W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola, “Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins,” *Methods* **29**, 97–109 (2003).
- [12] W. H. Stoothoff, B. J. Bacskai, and B. T. Hyman, “Monitoring Tau-Tubulin Interactions Utilizing Second Harmonic Generation in Living Neurons,” *J. Biomed. Opt.* **13**, 064039/1–17 (2008).
- [13] G. Mizutani and H. Sano, *Starch Image in Living Water Plants Observed by Optical Second Harmonic Microscopy*. “Science, Technology and Education of Microscopy, an Overview” (Microscopy Series No.1 Vol.2), ed. A. Mendez-Vilas (FORMATEX, Badajoz, Spain, 2003) pp.499-504.
- [14] H. C. Hieu, N. A. Tuan, H. Li, Y. Miyauchi, and G. Mizutani, “Sum frequency generation microscopy study of cellulose fibers,” *Appl. Spectrosc.* **65**, 1254–1259 (2011).
- [15] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola, and W. A. Mohler, “Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres,” *Biophys. J.* **90**, 693–703 (2006).
- [16] R. M. Brown, A. C. Millard, and P. J. Campagnola, “Macromolecular structure of cellulose studied by second-harmonic generation imaging microscopy,” *Opt. Lett.* **28**, 2207–2209 (2003).
- [17] O. Nadiarnykh, R. Lacombe, P. J. Campagnola, and W. A. Mohler, “Coherent and incoherent SHG in fibrillar cellulose matrices,” *Opt. Express* **15**, 3348–3360 (2007).

- [18] G. Mizutani, Y. Sonoda, H. Sano, M. Sakamoto, T. Takahashi, and S. Ushioda, “Detection of starch granules in a living plant by optical second harmonic microscopy,” *J. Lumin.* **824**, 87–89 (2000).
- [19] P. Guyot-Sionnest, H. Hsiung, and Y. R. Shen, “Surface polar ordering in a liquid crystal observed by optical second-harmonic generation,” *Phys. Rev. Lett.* **57**, 2963–2966 (1986).
- [20] W. Chen, M. B. Feller, and Y. R. Shen, “Investigation of anisotropic molecular orientational distributions of liquid-crystal monolayers by optical second-harmonic generation,” *Phys. Rev. Lett.* **63**, 2665–2668 (1989).
- [21] B. E. Cohen, “Biological imaging: Beyond fluorescence,” *Nature* **467**, 407–408 (2010).
- [22] P. J. Campagnola and L. M. Loew, “Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms,” *Nat. Biotechnol.* **21**, 1356–1360 (2003).
- [23] K. Yoshiki, M. Hashimoto, and T. Araki, “Second-harmonic-generation microscopy using excitation beam with controlled polarization pattern to determine three-dimensional molecular orientation,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, L1066–L1068 (2005).
- [24] M. Strupler, A. M. Pena, M. Hernest, P. L. Tharaux, J. L. Martin, E. Beaurinaire, and M. C. Schanne-Klein, “Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues,” *Opt. Express* **15**, 4054–4065 (2007).
- [25] L. Gailhouste, Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, N. Theret, and G. Baffet, “Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: A new tool in the assessment of liver fibrosis,” *J. Hepatol* **52**, 398–406 (2010).

- [26] G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi, and M. D. Gorrelle, “3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation,” *J. Struct. Biol.* **141**, 53–62 (2003).
- [27] E. Brown, T. McKee, E. diTomaso, A. Pluen, B. Seed, Y. Boucher, and R. K. Jain, “Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation,” *Nat. Med.* **9**, 796–800 (2003).
- [28] S. Zhuo, J. Chen, G. Wu, S. Xie, L. Zheng, X. Jiang, and X. Zhu, “Quantitatively linking collagen alteration and epithelial tumor progression by second harmonic generation microscopy,” *Appl. Phys. Lett.* **96**, 213704/1–3 (2010).
- [29] T. A. Theodossiou, C. Thrasivoulou, C. Ekwobi, and D. L. Beckery, “Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections,” *Biophys. J.* **91**, 4665–4677 (2006).
- [30] P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, F. Cicchi, C. Stringari, D. Kapsokalyvas, F. S. Pavone, and R. Pini, “Photothermally-induced disordered patterns of corneal collagen revealed by SHG imaging,” *Opt. Express* **17**, 4868–4878 (2009).
- [31] W. R. Zipfel, W. R. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7075–7080 (2003).
- [32] P.-F. Brevet, *Surface Second Harmonic Generation* (PPUR presses polytechniques, Lausanne, 1997).
- [33] Y.-R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics* (Wiley-Interscience, New York, 1984).
- [34] M. Hercher, “Laser-induced damage in transparent media,” *Journal of the Optical Society of America* **54**, 563 (1964).
- [35] R. Y. Chiao, E. Garmire, and C. Townes, “Self-trapping of optical beams,” *Physical Review Letters* **13**, 479 (1964).

- [36] G. Askaryan, “Effects of the gradient of a strong electromagnetic beam on electrons and atoms,” *Sov. Phys. J. Exp. Theor. Phys.* **15**, 1088–1090 (1962).
- [37] D. Strickland and G. Mourou, “Compression of amplified chirped optical pulses,” *Opt. Commun.* **56**, 219–221 (1985).
- [38] M. Pessot, P. Maine, and G. Mourou, “1000 times expansion/compression of optical pulses for chirped pulse amplification,” *Opt. Commun.* **62**, 419–421 (1987).
- [39] R. Gauderon, P. Lukins, and C. Sheppard, “Optimization of second-harmonic generation microscopy,” *Micron* **32**, 691–700 (2001).
- [40] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, “Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues,” *Biophys. J.* **82**, 493–508 (2002).
- [41] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7081–7086 (2003).
- [42] E. D. Palik, *Handbook of optical constants of solids*, vol. 3 (Academic press, Tokyo, 1985).
- [43] A. I. Usov, “Polysaccharides of the red algae,” *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **65**, 116 (2011).
- [44] J. McLachlan, “Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization,” *Plant Soil* **89**, 137–157 (1985).
- [45] J. Venkatesan, B. Lowe, S. Anil, P. Manivasagan, A. A. Al Kheraif, K.-H. Kang, and S.-K. Kim, “Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications,” *Starch-Stärke* **67**, 381–390 (2015).

- [46] K. Hatanaka, Y. Kurihara, T. Uryu, O. Yoshida, N. Yamamoto, T. Mimura, and Y. Kaneko, "A strong inhibition of HIV-induced cytopathic effects by synthetic (1 → 6)- α -d-mannopyranan sulfate," *Carbohydr. Res.* **214**, 147–154 (1991).
- [47] T. Uryu, N. Ikushima, K. Katsuraya, T. Shoji, N. Takahashi, T. Yoshida, K. Kanno, T. Murakami, H. Nakashima, and N. Yamamoto, "Sulfated alkyl oligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection," *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2385–2392 (1992).
- [48] Y. Gao, K. Katsuraya, Y. Kaneko, T. Mimura, H. Nakashima, and T. Uryu, "Synthesis, enzymatic hydrolysis, and anti-HIV activity of AZT- spacer- curd-lan sulfates," *Macromolecules* **32**, 8319–8324 (1999).
- [49] G. Borjihan, G. Zhong, H. Baigude, H. Nakashima, and T. Uryu, "Synthesis and anti-HIV activity of 6-amino-6-deoxy-(1 → 3)- β -D-curdlan sulfate," *Polym. Adv. Technol.* **14**, 326–329 (2003).
- [50] L. Cunha and A. Grenha, "Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications," *Mar. Drugs* **14**, 42 (2016).
- [51] S. Pereira, A. Zille, E. Micheletti, P. Moradas-Ferreira, R. De Philippis, and P. Tamagnini, "Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly," *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 917–941 (2009).
- [52] M. Okajima, M. Ono, K. Kabata, and T. Kaneko, "Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization," *Pure Appl. Chem.* **79**, 2039–2046 (2007).
- [53] M. Okajima, T. Bamba, Y. Kaneko, K. Hirata, S. Kajiyama, E. Fukusaki, and T. Kaneko, "Supergiant ampholytic sugar chains with imbalanced charge ratio form saline ultra-absorbent hydrogels," *Macromolecules* **41**, 4061–4064 (2008).

- [54] N. R. Ngatu, M. K. Okajima, L. S. Nangana, S. Vumi-Kiaku, T. Kaneko, S. Kanbara, R. D.-M. Wumba, and S. Wembonyama-Okitotsho, “Sacran, a new sulfated glycosaminoglycan-like polysaccharide from river alga *Aphanothecace sacrum* (Suringar) Okada alleviates hemorrhoid syndrome: Case report,” *Ann. Phytomedicine* **4**, 49–51 (2015).
- [55] N. R. Ngatu, R. Hirota, M. K. Okajima, T. Kaneko, K. F. Malonga, and N. Suganuma, “Sacran, a natural skin barrier enhancer, improves atopic and contact eczema: Case report,” *Ann. Phytomedicine* **4**, 111–113 (2015).
- [56] N. R. Ngatu, M. K. Okajima, M. Yokogawa, R. Hirota, M. Eitoku, B. A. Muzembo, N. Dumavibhat, M. Takaishi, S. Sano, T. Kaneko, and Others, “Anti-inflammatory effects of sacran, a novel polysaccharide from *Aphanothecace sacrum*, on 2, 4, 6-trinitrochlorobenzene-induced allergic dermatitis in vivo,” *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **108**, 117–122 (2012).
- [57] M. K. Okajima, D. Kaneko, T. Mitsumata, T. Kaneko, and J. Watanabe, “Cyanobacteria that produce megamolecules with efficient self-orientations,” *Macromolecules* **42**, 3057–3062 (2009).
- [58] T. Mitsumata, T. Miura, N. Takahashi, M. Kawai, M. Okajima, and T. Kaneko, “Ionic state and chain conformation for aqueous solutions of super-giant cyanobacterial polysaccharide,” *Phys. Rev. E* **87**, 042607/1–9 (2013).
- [59] M. Okajima, S. Miyazato, and T. Kaneko, “Cyanobacterial Megamolecule Sacran Efficiently Forms LC Gels with Very Heavy Metal Ions,” *Langmuir* **25**, 8526–8531 (2009).
- [60] M. K. Okajima, T. Higashi, R. Asakawa, T. Mitsumata, D. Kaneko, T. Kaneko, T. Ogawa, H. Kurata, and S. Isoda, “Gelation behavior by the lanthanoid adsorption of the cyanobacterial extracellular polysaccharide,” *Biomacromolecules* **11**, 3172–3177 (2010).

- [61] K. Amornwachirabodee, M. K. Okajima, and T. Kaneko, “Uniaxial swelling in LC hydrogels formed by two-step cross-linking,” *Macromolecules* **48**, 8615–8621 (2015).
- [62] Y. Zhao, K. T. T. Hien, G. Mizutani, H. N. Rutt, K. Amornwachirabodee, M. Okajima, and T. Kaneko, “Optical second-harmonic images of sacran megamolecule aggregates,” *J. Opt. Soc. Am. A* **34**, 146–152 (2017).
- [63] R. D. Deegan, O. Bakajin, F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, and T. A. Witten, “Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops,” *Nature* **389**, 827–829 (1997).
- [64] P. J. Yunker, T. Still, M. A. Lohr, and A. G. Yodh, “Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions,” *Nature* **476**, 308–311 (2011).
- [65] K. Ozawa, N. E., and M. Doi, “Modeling of the drying process of liquid droplet to form thin film,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, 4229–4234 (2005).
- [66] T. Kajiyama, E. Nishitani, T. Yamaue, and M. Doi, “Piling-to-buckling transition in the drying process of polymer solution drop on substrate having a large contact angle,” *Phys. Rev. E* **73**, 011601/1–5 (2006).
- [67] T. Kajiyama, D. Kaneko, and M. Doi, “Dynamical visualization of “coffee stain phenomenon” in droplets of polymer solution via fluorescent microscopy,” *Langmuir* **24**, 12369–12374 (2008).
- [68] C. W. Greer and W. Yaphe, “Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Bot. Mar.* **27**, 473–478 (1984).
- [69] H. C. Hieu, H. Li, Y. Miyauchi, G. Mizutani, N. Fujita, and Y. Nakamura, “Wetting effect on optical sum frequency generation (SFG) spectra of D-

- glucose, D-fructose, and sucrose,” *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **138**, 834–839 (2015).
- [70] S. Hizukuri, Y. Takeda, N. Maruta, and B. O. Juliano, “Molecular structures of rice starch,” *Carbohydrate Research* **189**, 227–235 (1989).
- [71] A. Imberty, A. Buléon, V. Tran, and S. Péerez, “Recent advances in knowledge of starch structure,” *Starch-Stärke* **43**, 375–384 (1991).
- [72] Y. Takeda, S. Hizukuri, and B. O. Juliano, “Purification and structure of amylose from rice starch,” *Carbohydrate research* **148**, 299–308 (1986).
- [73] D. J. Manners, “Recent developments in our understanding of amylopectin structure,” *Carbohydrate Polymers* **11**, 87–112 (1989).
- [74] T. A. Waigh, I. Hopkinson, A. M. Donald, M. F. Butler, F. Heidelbach, and C. Riekkel, “Analysis of the native structure of starch granules with X-ray microfocus diffraction,” *Macromolecules* **30**, 3813–3820 (1997).
- [75] G. Cox, N. Moreno, and Others, “Second-harmonic imaging of plant polysaccharides,” *Journal of Biomedical Optics* **10**, 24013–240136 (2005).
- [76] Z.-Y. Zhuo, C.-S. Liao, C.-H. Huang, J.-Y. Yu, Y.-Y. Tzeng, W. Lo, C.-Y. Dong, H.-C. Chui, Y.-C. Huang, H.-M. Lai *et al.*, “Second harmonic generation imaging — A new method for unraveling molecular information of starch,” *J. Struct. Biol.* **171**, 88–94 (2010).
- [77] Y. Miyauchi, H. Sano, and G. Mizutani, “Selective observation of starch in a water plant using optical sum-frequency microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. A* **23**, 1687–1690 (2006).
- [78] 松尾孝嶺・清水正治・角田重三郎・村田吉男・熊沢喜久雄・蓬原雄三・星川清親・石原邦・平田熙・石井龍一, 稻学大成「第2卷」生理編 (Rural Culture Association, 東京, 1990).

- [79] H. Li, Y. Miyauchi, N. A. Tuan, G. Mizutani, and M. Koyano, “Optical sum frequency generation image of rice grains,” *J. Biomater. Nanobiotech.* **3**, 286–291 (2012).
- [80] 高橋成人, “稲種子の発芽に関する生理遺伝学的研究 : とくに発芽を支配する遺伝要因について,” *農学研究所彙報* **14**, 1–87 (1962).
- [81] T. Murata, T. Akazawa, and S. Fukuchi, “Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds I. An Analytical Study¹,” *Plant Physiology*. **43**, 1899–1905 (1968).
- [82] K. Okamoto and T. Akazawa, “Enzymic mechanisms of starch breakdown in germinating rice seeds 7. Amylase formation in the epithelium,” *Plant physiology* **63**, 336–340 (1979).
- [83] A. Ochiai, H. Sugai, K. Harada, S. Tanaka, Y. Ishiyama, K. Ito, T. Tanaka, T. Uchiumi, M. Taniguchi, and T. Mitsui, “Crystal structure of α -amylase from *Oryza sativa*: molecular insights into enzyme activity and thermostability,” *Biosci. Biotechnol. Biochem* **78**, 989–997 (2014).
- [84] D. Débarre, W. Supatto, A.-M. Pena, A. Fabre, T. Tordjmann, L. Combettes, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy,” *Nature methods* **3**, 47–53 (2006).
- [85] C. Saito, M. T. Morita, T. Kato, and M. Tasaka, “Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem,” *Plant Cell* **17**, 548–558 (2005).
- [86] E. L. Vigil and M. Ruddat, “Development and enzyme activity of protein bodies in proteinoplasts of tobacco root cells,” *Histochemistry* **83**, 17–27 (1985).
- [87] R. R. Wise, “The diversity of plastid form and function,” in “The structure and function of plastids,” (Springer, 2007), pp. 3–26.

- [88] S. Fine and W. P. Hansen, "Optical second harmonic generation in biological systems," *Appl. Opt.* **10**, 2350–2353 (1971).
- [89] S. Kubik, "High-Performance Fibers from Spider Silk," *Angew. Chem. Int. Edit.* **41**, 2721–2723 (2002).
- [90] R. V. Lewis, "Spider silk: ancient ideas for new biomaterials," *Chem. Rev.* **106**, 3762–3774 (2006).
- [91] J. M. Gosline, M. W. Denny, and M. E. DeMont, "Spider silk as rubber," *Nature* **309**, 551–552 (1984).
- [92] F. Vollrath and D. Porter, "Spider silk as archetypal protein elastomer," *Soft Matter* **2**, 377–385 (2006).
- [93] J. Gosline, P. Guerette, C. Ortlepp, and K. Savage, "The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function," *J. Exp. Biol.* **202**, 3295–3303 (1999).
- [94] A. Sponner, E. Unger, F. Grosse, and K. Weisshart, "Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread," *Biomacromolecules* **5**, 840–845 (2004).
- [95] D. Kaplan, W. W. Adams, B. Farmer, and C. Viney, *Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology* (American Chemical Society, Washington, DC, 1994).
- [96] D. T. Grubb and L. W. Jelinski, "Fiber morphology of spider silk: the effects of tensile deformation," *Macromolecules* **30**, 2860–2867 (1997).
- [97] C. L. Craig, *Spiderwebs and Silk: Tracing Evolution from Molecules to Genes to Phenotypes* (Oxford Univ. Press, Oxford, 2003).
- [98] R. F. Foelix *et al.*, *Biology of Spiders* (Harvard Univ. Press, London, 1982).
- [99] S. O. Andersen, "Amino acid composition of spider silks," *Comp. Biochem. Physiol.* **35**, 705–711 (1970).

- [100] P. A. Guerette, D. G. Ginzinger, B. H. Weber, and J. M. Gosline, "Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family," *Science* **272**, 112 (1996).
- [101] J. Gatesy, C. Hayashi, D. Motriuk, J. Woods, and R. Lewis, "Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences," *Science* **291**, 2603–2605 (2001).
- [102] J. E. Garb, T. DiMauro, V. Vo, and C. Y. Hayashi, "Silk genes support the single origin of orb webs," *Science* **312**, 1762–1762 (2006).
- [103] L. Römer and T. Scheibel, "The elaborate structure of spider silk," *Prion* **2**, 154–161 (2008).
- [104] M. S. Engster, "Studies on silk secretion in the Trichoptera (F. Limnephiliidae)," *Cell Tissue Res.* **169**, 77–92 (1976).
- [105] Y. Termonia, "Molecular modeling of spider silk elasticity," *Macromolecules* **27**, 7378–7381 (1994).
- [106] J. Kümmerlen, J. Van Beek, F. Vollrath, and B. Meier, "Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance," *Macromolecules* **29**, 2920–2928 (1996).
- [107] J. Van Beek, J. Kümmerlen, F. Vollrath, and B. Meier, "Supercontracted spider dragline silk: a solid-state NMR study of the local structure," *Int. J. Biol. Macromolec.* **24**, 173–178 (1999).
- [108] N. Lazo and D. T. Downing, "Crystalline regions of *Bombyx mori* silk fibroin may exhibit β -turn and β -helix conformations," *Macromolecules* **32**, 4700–4705 (1999).
- [109] C. Y. Hayashi and R. V. Lewis, "Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks," *J. Mol. Biol.* **275**, 773–784 (1998).

- [110] M. A. Colgin and R. V. Lewis, “Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like “spacer regions”,” *Protein Sci.* **7**, 667–672 (1998).
- [111] A. H. Simmons, C. A. Michal, and L. W. Jelinski, “Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk,” *Science* **271**, 84–87 (1996).
- [112] Y. Zhao, K. T. T. Hien, G. Mizutani, and H. N. Rutt, “Second-order nonlinear optical microscopy of spider silk,” *Appl. Phys. B* **123**, 188 (2017).
- [113] D. H. Hijirida, K. G. Do, C. Michal, S. Wong, D. Zax, and L. W. Jelinski, “¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland.” *Biophys. J.* **71**, 3442–3447 (1996).
- [114] C. Riek, C. Bränden, C. Craig, C. Ferrero, F. Heidelbach, and M. Müller, “Aspects of X-ray diffraction on single spider fibers,” *Int. J. Biol. Macromolec.* **24**, 179–186 (1999).
- [115] J. P. O’Brien, S. R. Fahnestock, Y. Termonia, and K. H. Gardner, “Nylons from nature: synthetic analogs to spider silk,” *Adv. Mater.* **10**, 1185–1195 (1998).
- [116] S. Ulrich, A. Glišović, T. Salditt, and A. Zippelius, “Diffraction from the β -sheet crystallites in spider silk,” *Eur. Phys. J. E* **27**, 229–242 (2008).
- [117] F. Vollrath and D. P. Knight, “Liquid crystalline spinning of spider silk,” *Nature* **410**, 541–548 (2001).
- [118] E. J. Spek, H.-C. Wu, and N. R. Kallenbach, “The role of alanine sequences in forming β -sheets of spider dragline silk,” *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5053–5054 (1997).
- [119] C. Y. Hayashi, N. H. Shipley, and R. V. Lewis, “Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins,” *Int. J. Biol. Macromolec.* **24**, 271–275 (1999).

- [120] B. Thiel and C. Viney, “ β -sheets and spider silk,” *Science* **273**, 1477–1480 (1996).
- [121] J. Warwicker, “Comparative studies of fibroins: II. The crystal structures of various fibroins,” *J. Mol. Biol.* **2**, 350–362, IN1 (1960).
- [122] S. Kubik, “High-Performance Fibers from Spider Silk,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2721–2723 (2002).
- [123] F. S. Pavone and P. J. Campagnola, *Second Harmonic Generation Imaging Ch. 18* (CRC Press, London, 2013), pp. 421–422.
- [124] W. L. Rice, S. Firdous, S. Gupta, M. Hunter, C. W. Foo, Y. Wang, H. J. Kim, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, “Non-invasive characterization of structure and morphology of silk fibroin biomaterials using non-linear microscopy,” *Biomaterials* **29**, 2015–2024 (2008).
- [125] J. A. Kluge, O. Rabotyagova, G. G. Leisk, and D. L. Kaplan, “Spider silks and their applications,” *Trends Biotechnol.* **26**, 244–251 (2008).
- [126] D. Knight and F. Vollrath, “Liquid crystals and flow elongation in a spider’s silk production line,” *Proc. R. Soc. B* **266**, 519–523 (1999).
- [127] R. W. Work, “Dimensions, birefringences, and force-elongation behavior of major and minor ampullate silk fibers from orb-web-spinning spiders—the effects of wetting on these properties,” *Text. Res. J.* **47**, 650–662 (1977).
- [128] A. D. Parkhe, S. K. Seeley, K. Gardner, L. Thompson, and R. V. Lewis, “Structural studies of spider silk proteins in the fiber,” *J. Mol. Recogn.* **10**, 1–6 (1997).
- [129] C. Riek, M. Müller, and F. Vollrath, “In situ X-ray diffraction during forced silking of spider silk,” *Macromolecules* **32**, 4464–4466 (1999).

- [130] C. Riekel and F. Vollrath, “Spider silk fibre extrusion: combined wide-and small-angle X-ray microdiffraction experiments,” *Int. J. Biol. Macromolec.* **29**, 203–210 (2001).
- [131] J. Van Beek, S. Hess, F. Vollrath, and B. Meier, “The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10266–10271 (2002).
- [132] O. Liivak, A. Flores, R. Lewis, and L. W. Jelinski, “Conformation of the polyalanine repeats in minor ampullate gland silk of the spider *Nephila clavipes*,” *Macromolecules* **30**, 7127–7130 (1997).
- [133] N. Bloembergen, *Nonlinear Optics* (Addison-Wesley World Publishing Co., Inc., Redwood City, California, 1992).
- [134] H.-J. Jin, J. Park, V. Karageorgiou, U.-J. Kim, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, “Water-Stable Silk Films with Reduced β -Sheet Content,” *Adv. Funct. Mater.* **15**, 1241–1247 (2005).
- [135] J. D. Sipe and A. S. Cohen, “Review: history of the amyloid fibril,” *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000).

研究業績

学術雑誌の論文

- **Yue Zhao**, Khuat Thi Thu Hien, Goro Muzitani, Harvey N. Rutt, Kitima Amornwachirabodee, Maiko Okajima, and Tatsuo Kaneko, “Optical second-harmonic images of sacran megamolecule aggregates”, *J. Opt. Soc. of Am. A.* **34**, 146-152 (2017).
- **Yue Zhao**, Khuat Thi Thu Hien, Goro Muzitani and Harvey N. Rutt, “Second-order nonlinear optical microscopy of spider silk”, *Appl. Phys. B* **123**, 188 (2017).
- Airong Qiagedeer, Bulbul Maira, Roman Strauss, **Yue Zhao**, Patchanee Chammingkwan, Goro Mizutani and Toshiaki Taniike, “Preparation and characterization of polypropylene/noble metal nanocomposites based on reactor granule technology”, *Polymer* **127**, 251-258 (2017).
- **Yue Zhao**, Yanrong Li, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Nobuaki Ito, Harvey N. Rutt, Maiko Okajima and Tatsuo Kaneko, “Electric field effect on optical second-harmonic generation of amphoteric megamolecule aggregates”, *J. Phys. Soc. Jpn.* **86**, 124401 (2017).

国際会議における発表

- (ポスター発表 査読有り)
Yue Zhao, Khuat Thi Thu Hien, Goro Muzitani, Ryosuke Mishima, Maiko Okajima, and Tatsuo Kaneko, Asymmetry detection of ultra-macromolecule sacran by femtosecond SHG microscopy, *The 7th International Symposium on Surface Science*, **3PN-23**, Matsue, Shimane, Japan, November 2014.

- (ポスター発表 査読有り)
Yue Zhao, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Harvey Rutt, Kit-tima Amornwachirabodee, Maiko Okajima, and Tatsuo Kaneko, Asymmetry Detection in Megamolecules by Second-Order Nonlinear Optical Microscopy, *Single-Molecule Microscopy and Spectroscopy Faraday Discussion*, **P05**, London, UK, September 2015.
- (招待講演)
 Goro Mizutani, Yue Zhao, Khuat Thi Thu Hien, Harvey N. Rutt, Kit-tima Amornwachirabodee, Maiko Okajima, and Tatsuo Kaneko, Optical second harmonic microscopy of sacran fibers and films, *7th Annual and 1st International Symposium on Sacran*, Kyushu, Japan, November 2015.
- (口頭発表 査読有り)
Yue Zhao, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Harvey Rutt, Spider Silk Observed by Femtosecond SHG Microscopy, *EMAS 2017 - 15th European Workshop on Modern Developments and Applications in Microbeam Analysis and IUMAS-7 Meeting*, **311**, Konstanz, Germany, May 2017.
- (口頭発表 査読有り)
Yue Zhao, Yanrong Li, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Harvey Rutt, Observation of spider silk by femtosecond pulse laser second harmonic generation microscopy, *11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17*, **5p-P-45**, Kauai, Hawaii, USA, December 2017.

国内学会における発表

- (口頭発表 査読なし)
趙越, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, 三島僚介, 岡島麻衣子, 金子達雄, 二次の非線形光学顕微鏡による非対称性の検出を用いた超巨大分子サクランの構造分析, 日本物理学会第70回年次大会, 22aCP-10, 東京, 2015年3月.

- (ポスター発表 査読なし)

趙越, 水谷五郎, Khuat Thi Thu Hien, Kittima Amornwachirabodee, 岡島麻衣子, 金子達雄, SHG 顕微鏡を用いた超巨大分子サクランの凝集体の非対称性検出, 日本物理学会 [物性] 2015 年秋季大会, 18pPSA-38, 大阪, 2015 年 9 月.
- (口頭発表 査読なし)

趙越, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, Harvey N. Rutt, Kittima Amornwachirabodee, 岡島麻衣子, 金子達雄, SHG 顕微鏡によるサクラン分子配向の非対称性検出, 2015 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会, D-p10, 金沢, 2015 年 11 月.
- (ポスター発表 査読なし)

趙越, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, Harvey N. Rutt, Kittima Amornwachirabodee, 岡島麻衣子, 金子達雄, フェムト秒パルスレーザー励起による光第二次高調波顕微鏡を用いたサクラン繊維とサクラン薄膜の観察, 第 26 回光物性研究会, IIIB-104, 神戸, 2015 年 12 月.
- (ポスター発表 査読なし)

趙越, 王藍瑤, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, フェムト秒レーザーによるガラス基板上の FAS 自己集積化分子膜の加工, 日本物理学会 [物性]2016 年秋季大会, 13pPSB-63, 金沢, 2016 年 9 月.
- (口頭発表 査読なし)

高橋祥吾, 趙越, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, フェムト秒 SHG 顕微鏡による米種子断面の観察, 日本物理学会 [物性]2016 年秋季大会, 16aAL-11, 金沢, 2016 年 9 月.
- (招待講演)

水谷五郎, 趙越, Khuat Thi Thu Hien, Harvey N. Rutt, SHG 顕微鏡によるサクラン繊維とサクラン薄膜中の異なった凝集状態の観察, 第 8 回サクラン研究会年次学術集会, 熊本, 2016 年 10 月.

- (ポスター発表 査読なし)

高橋祥吾, 趙越, Khuat Thi Thu Hien, 水谷五郎, フェムト秒 SHG 顕微鏡による米種子断面の観察, 第 27 回光物性研究会, III B-76, 神戸, 2016 年 12 月.

特許

- 特願 2017-167219, 水谷五郎, 趙越, クアット ティ ツー ヒエン.

2017 年 12 月

謝 辞

本研究を進めるにあたり、繰り返し親身になって終始あたたかいご指導を賜りました恩師の水谷五郎教授に心より感謝申し上げます。この数年間、水谷先生からは科学技術を学んだだけでなく、より多くの研究の哲学も学ぶことができました。「実験は思い通りにいかないとき、たよりになるのが面白いと思う心です。」これは先生に教わったことで、私も同感です。研究の内容を好きになって楽しもうとすることが、真理に近づく姿勢です。論語にも「知之者不如好之者、好之者不如樂之者」という同じような文句があります。好きこそ物の上手なれ、さらに、物事を心から楽しんでいることが最高の態度です。まさしく先生に教わったとおりです。さらに、私は科学研究に従事する最大のきっかけは好奇心であると思います。科学研究者として興味は研究の原動力で、好奇心が新たな問題を発見するための鍵です。その鍵を握って、奇妙な現象に直面しているときに、思わずその真実を探索しようという熱意が出てきます。叡智を愛することは“Philosophy”であり、学問に対する根本的な態度だと思っています。水谷先生の研究哲学は、私の研究の航路を示す灯台のようだと感じました。

本研究において、サクランに関する部分は、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系の金子研究室と共同研究をして、サクランの製作は金子研究室の指導で行ないました。金子研究室の金子達雄教授、岡島麻衣子先生、桶葎興資助教には、丁寧なご説明・ご指導をしていただき、深く感謝いたします。金子研究室出身の Kittima Amornwachirabodee 博士には、試料の提供や研究に関する有意義な討論をいただき、大変お世話になって、お礼申し上げます。

副テーマの研究は北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系の筒井研究室で行いました。筒井秀和准教授には、試料の提供や研究に関するご指導やアドバイスをいただき、深く感謝いたします。

また、University of Southampton からの訪問学者 Harvey N. Rutt 教授には、有意義な討論やアドバイスをいただき、深く感謝いたします。

本論文を作成や日常の議論を通じて多くのご意見やアドバイスを頂いた同研究室の Khuat Thi Thu Hien 助教にお礼申し上げます。そして、日常の研究や勉強など多大な協力をしていただいた同研究室の皆様にお礼申し上げます。

私は小さい頃、初めて磁石を手に入ったとき、すごく喜びました。幼い僕は接触せずに互いに力が働くことに驚きました。二つの磁石の間に新聞紙や手を入れても、その磁石間の力が消えないという不思議な現象が僕の自然あるいは科学への好奇心がそそられました。祖父は「磁石は二つの極があって、違う極同士が引き合う、同じ極同士が退け合う」と教えてくれました。その磁石を一番大事な宝物のおもちゃとして持っていました。様々なものに引いてるみて、科学的な本質がわからないが、とても楽しいでした。それは僕の人生の初めての科学実験のかなど、今考えたら笑いました。そして、小学5年生のとき、「自然」という科目がありました。教育資源が今のように豊富ではない時代だったが、当時の私の小学校は市から理科教育を試験的に実施する小学校に指定されて、理科実験室を設けました。私は運が良く、あの実験室の初代利用者になりました。ある酸素の実験で、「火を消したマッチを酸素に入れて火が復活、酸素の中で花火のように燃やした細い鉄線」など日常生活でありえない現象を見た私は初めて科学の魅力を感じました。さらに6年生のとき、授業の中で、電線を使って電磁石を作ろうという宿題がありました。夜は母親に、スチールの針が私が巻いたコイル電磁石にくっつく様子を見せました。ちょうどその夜に、祖父の友人が家に訪ねてきました。あの人は電気モーターのエンジニアでした。私の実験を見て「アンペールの右ねじの法則」を教えてくれました。私はその法則を理解した上で、極性がわかる電磁石を作って、先生に褒められてすごく嬉しいでした。こういう子供頃の小さなことから、科学に興味があった、科学が好きになった。その小さい頃の科学への好奇心は今でもかわっていません。ズバリ科学への好奇心は私の研究に支える一番重要な柱と思っています。

大学学部時代の私に、学術研究の道での歩き方、生き方、思考方法を教えてくださいました電気通信大学情報理工学域張賛准教授に心より感謝いたします。そして、大学学部時代に、お世話になった電気通信大学情報理工学域渡辺昌良教授、岡田佳子准教授に深くお礼申し上げます。

石川県私費外国人留学生奨学金を1年間授与していただいた石川県に深くお礼申し上げます。

修士課程ロータリー米山記念奨学金を1年間授与していただいた公益財団法人ロータリー米山記念奨学会、国際ロータリー第2610地区ロータリー米山記念奨学会委員会に深くお礼申し上げます。

文部科学省外国人留学生学習奨励費を2年9ヶ月間授与していただいた日本学生支援機構(JASSO)に深くお礼申し上げます。

最後、私を幸せいっぱい育ててくれて、いつもあたたかく見守ってくれた両親に心より深く感謝します。

2017年12月